



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, 9/10, C07K 16/40, C12N 1/00, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/29879 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Juni 1999 (17.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08001 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Dezember 1998 (09.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 54 622.6 9. Dezember 1997 (09.12.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: VON SCHAEWEN, Antje [DE/DE]; Natruper Strasse 169a, D-49076 Osnabrück (DE). (74) Anwalt: WIBBELMANN, Jobst; Wuesthoff & Wuesthoff, Schweigerstrasse 2, D-81541 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: VEGETABLE <i>GnII</i> SEQUENCES AND THE USE THEREOF TO OBTAIN PLANTS WITH A REDUCED OR LACK OF N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE I (GnTI) ACTIVITY (54) Bezeichnung: PFLANZLICHE <i>GnII</i> -SEQUENZEN UND VERWENDUNG DERSELBEN ZUR GEWINNUNG VON PFLANZEN MIT VERMINDERTER ODER FEHLENDER N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE I (GnTI)-AKTIVITÄT (57) Abstract <p>The invention relates to vegetable <i>GnII</i> sequences, especially vegetable nucleic acid sequences coding the enzyme N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), DNA sequences derived therefrom including <i>GnII</i> antisense and sense constructs, and the products thereof, antibodies directed against these translation products and to the use of sequence information to obtain transformed micro-organisms and transgenic plants including those with reduced or a lack of N-acetylglucosaminyl-transferase I activity. Such plants with a reduced or lack of N-acetylglucosaminyl-transferase I activity are highly important for the production of glycoproteins having a specific constitution in relation to sugar residues.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft pflanzliche <i>GnII</i>-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, davon abgeleitete DNA-Sequenzen einschließlich <i>GnII</i>-<i>"antisense"</i>- und <i>"sense"</i>-Konstrukten, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Pflanzliche GntI-Sequenzen und Verwendung derselben zur
Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender
N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität

Die Erfindung betrifft pflanzliche GntI-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, wie auch davon abgeleitete GntI-„antisense“- bzw. „sense“-Konstrukte, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

Stand der Technik:

In Eukaryonten werden Glykoproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) cotranslational (d.h. bei Import in das ER-Lumen) durch Verknüpfung von zunächst membrangebundenen Glykanen (an Dolicholpyrophosphat) mit spezifischen Asparagin-Resten in der wachsenden Polypeptidkette zusammengesetzt (N-Glykosylierung). In höheren Organismen unterliegen Zuckereinheiten, die an der Oberfläche der gefalteten Polypeptidkette liegen, in den Golgi-Zisternen weiteren Trimm- und Modifikationsreaktionen (Ref. 1). Durch verschiedene Glykosidasen und Glykosyltransferasen im ER werden zunächst typische $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Grundeinheiten des „high“-Mannose-Typs gebildet und anschließend bei Passage durch die verschiedenen Golgi-Zisternen in sogenannte „komplexe“ Glykane umgewandelt. Letztere zeichnen sich durch weniger Mannose-

- 2 -

Einheiten und den Besitz weiterer Zuckerreste, wie Fucose, Galaktose und/oder Xylose in Pflanzen bzw. Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure, NeuNAc) in Säugern, aus (Ref. 1,2,3). Das Ausmaß der Modifikationen ist von Glykoprotein zu Glykoprotein verschieden. Einzelne Polypeptidketten können heterogene Zuckerketten tragen. Zudem kann das Glykosylierungsmuster für ein bestimmtes Polypeptid variieren (gewebespezifische Unterschiede), und muß auch nicht immer bezüglich einer bestimmten Glykosylierungsstelle gleich sein, was als „Mikroheterogenität“ bezeichnet wird (Ref. 4,5). Die Rolle von Asparagin-ständigen Glykanen ist bislang kaum verstanden, was u.a. daraus resultiert, daß diese mehrere Funktionen erfüllen können (Ref. 6). Jedoch ist anzunehmen, daß beispielsweise der Schutz einer Polypeptidkette vor proteolytischem Abbau auch durch Glykane eines einfacheren Oligomannosyl-Typs gewährleistet werden kann (Ref. 7).

Problemstellung:

Glykoproteine sind für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Eine Isolierung von Glykoproteinen im Großmaßstab ist jedoch aufwendig und teuer. Die direkte Anwendung konventionell isolierter Glykoproteine ist oft problematisch, da einzelne Reste der Glykan-Komponenten bei Verabreichung als Therapeutikum ungewünschte Nebenwirkungen auslösen können. Dabei trägt die Glykan-Komponente vor allem zu den physikochemischen Eigenschaften (wie Faltung, Stabilität und Löslichkeit) der Glykoproteine bei. Des weiteren tragen isolierte Glykoproteine, wie bereits ausgeführt, selten einheitliche Zuckerreste, was als „Mikroheterogenität“ bezeichnet wird.

Hefen erweisen sich zur Gewinnung von Glykoproteinen für Medizin und Forschung als ungeeignet, da sie nur Glykosylierungen zum sogenannten „high“-Mannose-Typ durchführen können. Insekten und höhere Pflanzen zeigen zwar „komplexe“, aber von Tieren abweichende Glykoproteinmodifikationen. Aus Pflanzen isolierte Glykoproteine wirken deshalb in Säugern stark antigen. Tieri-

- 3 -

sche Organismen mit Glykosylierungsdefekten sind meist nicht lebensfähig, da die terminalen Glykan-Reste (beispielsweise membranständiger Glykoproteine) meist biologische Signalfunktion besitzen und vor allem für die Zell-Zellerkennung während der Embryonalentwicklung unentbehrlich sind. Es existieren zwar bereits Säugerszelllinien mit definierten Glykosylierungsdefekten, jedoch ist deren Kultivierung arbeitsintensiv und teuer.

Im Einzelnen wurden für Säuger auf Zellkulturebene bereits unterschiedliche Glykosylierungsmutanten beschrieben (Ref. 7,8, 9,10). Diese Mutanten sind entweder in der Biosynthese reifer Oligosaccharidketten am Dolicholpyrophosphat oder in der Glykan-Prozessierung betroffen bzw. zeigen Abweichungen in ihren terminalen Zuckerresten. Einige dieser Zelllinien weisen einen konditional-lethalen Phänotyp auf oder zeigen Defekte im intrazellulären Proteintransport. Die Folgen dieser Defekte für den intakten Organismus sind schwer abschätzbar. Es wurde beobachtet, daß eine Veränderung im Muster komplexer Glykane auf Zelloberflächen von Säugern mit Tumor- und Metastasenbildung einhergeht, obwohl eine funktionale Beziehung noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Ref. 9). Glykosylierungsmutanten kommen in Säugern daher sehr selten vor. Diese unter HEMPAS (Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum lysis test) zusammengefaßten Defekte (Ref. 10,11) beruhen entweder auf einem Defizit von Mannosidase II und/oder niedrigen Gehalten des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase II (GnTII) und wirken sich stark einschränkend auf die Lebensfähigkeit des mutierten Organismus aus. *GntI*-"knock out"-Mäuse, in denen das Gen für GnTI zerstört wurde, sterben bereits „in utero“ an multiplen Entwicklungsdefekten (mündliche Mitteilung, H. Schachter, Toronto).

Für Pflanzen waren bis vor kurzem keine vergleichbaren Mutanten bekannt. Durch den Einsatz eines Antiserums, das spezifisch „komplex“-modifizierte Glykanketten pflanzlicher Glykoproteine erkennt und hauptsächlich gegen die hoch-antigenen $\beta 1 \rightarrow 2$ verknüpften Xylose-Reste gerichtet ist (Ref. 12), konnte die An-

- 4 -

melderin aus einer EMS-mutagenisierten F2-Population der genetischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* mehrere unabhängige Mutanten isolieren, die keine „komplexe“ Glykoproteinmodifikation mehr zeigten (complex glycan, cgl-Mutanten). Nach mindestens fünf Rückkreuzungen, jeweils gefolgt von intermittierenden Selbstungen (zum Wiederauffinden des rezessiven Defekts), wurden die Glykoproteine analysiert. Diese trugen hauptsächlich Glykane des $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -Typs, was auf einen Defekt in N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) hindeutete (Ref. 8). Tatsächlich fehlte den *Arabidopsis* cgl-Mutanten GnTI-Aktivität (Ref. 13), welche normalerweise die erste Reaktion im Syntheseweg zu „komplex“ modifizierten Zuckerketten katalysiert (Ref. 1). Nach bisherigen Beobachtungen resultiert daraus allerdings keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der mutierten Pflanzen. In neueren Publikationen werden Pflanzen als mögliche Quelle zur Herstellung von pharmazeutisch relevanten Glykoproteinen oder Vakzinen vorgeschlagen (Ref. 14,15). Darin wird jedoch übersehen, daß aus Pflanzen isolierte Glykoproteine in Säugern starke Immunreaktionen auslösen können, was bisher einer Produktion heterologer Glykoproteine in Kulturpflanzen im Wege stand.

Pflanzen kommen weitgehend ohne „komplex“ modifizierte Glykoproteine aus, wie die Anmelderin am Beispiel der *Arabidopsis* cgl-Mutante zeigen konnte (Ref. 13). In der Mutante werden sekretorische Proteine im ER zunächst normal glykosyliert. Im Golgi-Apparat der cgl-Mutante bleiben die über Asparagin-Reste (N-Glykosylierung) an das Polypeptidrückgrat gebundenen Oligomannosylketten dann jedoch auf Stufe von $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -Resten stehen, da N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität fehlt (Fig. 1). Durch diesen Biosyntheseblock wird die pflanzenspezifische „komplexe“ Glykoproteinmodifikation und insbesondere die Anheftung von $\alpha 1 \rightarrow 3$ Fukose- und $\beta 1 \rightarrow 2$ Xylose-Resten verhindert, wodurch die stark antigene Wirkung auf den Säugerorganismus entfällt. Als krautige Pflanze besitzt *Arabidopsis* jedoch wenig verwertbare Biomasse. Zur Herstellung von biotech-

- 5 -

nologisch relevanten Glykoproteinen im Großmaßstab sind diese *cgl*-Pflanzen deshalb weniger geeignet. Als Alternative wären Kultursorten, insbesondere Solanaceen, wie z.B. Kartoffel, Tabak, Tomate oder Paprika, und des weiteren Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis, und Getreide, mit fehlender oder stark gedrosselter GntI-Aktivität ideal zur Produktion von heterologen Glykoproteinen in Pflanzen. Dazu würden sich Verfahren des „homology-dependent gene silencing“ (Ref. 16,17) anbieten.

Wie Fig. 3 zeigt, ist die Homologie der ersten ermittelten pflanzlichen *GntI*-Sequenz aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L., St) im Vergleich mit den entsprechenden bekannten Sequenzen aus tierischen Organismen außerordentlich niedrig (nur 30-40% Identität auf Proteinebene, vgl. Fig. 3A), so daß eine effiziente Drosselung der endogenen „komplexen“ Glykoproteinmodifikation in Pflanzen mittels „antisense“ bzw. „sense“-Suppression (Ref. 21) durch die Verwendung bereits bekannter heterologer *GntI*-Gen-sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht erreicht werden kann.

Für Medizin und Forschung besteht daher nach wie vor ein Bedarf, rekombinante Glykoproteine mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten in geeigneten Organismen kostengünstig herstellen zu können.

Wesen der Erfindung:

Nachdem die Anmelderin erstmals pflanzliche *GntI*-cDNA-Sequenzen isolieren und aufklären konnte, ist es nun u.a. möglich, beliebige Pflanzen mit gedrosselter oder fehlender GntI-Aktivität zu gewinnen, insbesondere herzustellen, bzw. entsprechende Mutanten durch revers-genetische Ansätze nach Transposon- (Ref. 18) bzw. T-DNA-Insertion (Ref. 19) aufzuspüren, um in diesen dann Glykoproteine mit niedrigem Antigenpotential zu produzieren.

- 6 -

i) Enzyme:

Die Erfindung umfaßt allgemein verschiedene N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme (EC 2.4.1.101) aus Pflanzen, z.B. aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) und *Arabidopsis thaliana*. Insbesondere betrifft die Erfindung die Enzyme, die die in Fig. 2 und 3B sowie in dem beigefügten Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen aufweisen oder enthalten.

Von der Erfindung umfaßt sind ferner von den Aminosäuresequenzen der genannten Enzyme durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -modifikation oder durch C- und/oder N-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme, die, sofern sie enzymatische Aktivität zeigen, eine dem Ausgangsenzym vergleichbare Spezifität, also N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, sowie ggf. vergleichbare Aktivität aufweisen.

Unter einer vergleichbaren Aktivität wird im vorliegenden Zusammenhang eine Aktivität verstanden, die bis zu 100% über oder unter der Aktivität des Ausgangsenzyms liegt. Von der Erfindung sind dementsprechend auch abgeleitete Enzyme oder Proteine mit sehr geringer oder vollständig fehlender enzymatischer Aktivität, nachweisbar mittels eines oder mehrerer der nachfolgend angegebenen Tests, umfaßt. Zum Nachweis der Enzymaktivität dient ein Standard-Test, der mit Mikrosomen-Fraktionen entweder radioaktiv, z.B. mit UDP-[6-³H]GlcNac als Substrat (Ref. 13), oder nicht-radioaktiv (HPLC-Methode; Ref. 20) durchgeführt wird. Pflanzliche GnTI-Aktivität kann subzellulär in Golgi-Fraktionen nachgewiesen werden (Ref. 21). Enzymanreicherungen aus Pflanzen sind aufgrund der geringen Ausbeuten jedoch nahezu unmöglich.

Gegebenenfalls alternativ kann ein erfindungsgemäßes abgeleitetes Enzym als ein Enzym definiert werden, für das eine das Enzym kodierende DNA-Sequenz ermittelt oder abgeleitet werden

- 7 -

kann, die mit der das Ausgangsenzym kodierenden DNA-Sequenz bzw. der dazu komplementären Sequenz unter stringenten Bedingungen, wie sie nachfolgend definiert werden, hybridisiert.

Ein dergestalt abgeleitetes Enzym stellt beispielsweise eine Isoform dar, die die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 und 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt. Dieser Isoform fehlt u.a. der durch die Aminosäuren 10 bis 29 gebildete Membrananker, so daß diese Enzym-Isoform möglicherweise aufgrunddessen im Cytosol der Pflanze lokalisiert ist.

Als Beispiele für C- und/oder N-terminal verlängerte Proteine können Fusionsproteine genannt werden, die neben einer erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz ein weiteres Protein umfassen, das beispielsweise eine andersartige enzymatische Aktivität aufweist oder auf andere Weise, z.B. aufgrund von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz oder aufgrund einer Reaktivität mit spezifischen Antikörpern oder durch Binden an entsprechende Affinitätsmatrices, leicht nachweisbar ist.

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Fragmente der genannten Enzyme, die ggf. keine enzymatische Aktivität mehr aufweisen. Diese Fragmente zeigen in der Regel jedoch antigene Wirkung in einem damit immunisierten Wirt und können folglich als Antigen zur Erzeugung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Wirtes mit diesen eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die zugänglich sind aufgrund der Hybridisierung ihrer Gene oder eines oder mehrerer Abschnitte ihrer Gene

- mit einer oder mehreren der nachfolgend erläuterten erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmente und/oder
- mit geeigneten erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden, die ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hergestellt werden können.

- 8 -

Von der Erfindung umfaßt sind ferner nach den vorstehend erläuterten Maßgaben von diesen N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzymen abgeleitete Enzyme oder Proteine, einschließlich Fusionsproteinen von diesen, sowie Fragmente aller dieser Enzyme oder Proteine.

ii) Antikörper

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung der vorstehend genannten Aminosäuresequenzen bzw. von antigen wirk-samen Fragmenten davon zur Erzeugung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern oder -seren durch Immunisierung von Wirten mit diesen Aminosäuresequenzen bzw. Fragmenten sowie Antikörper bzw. -seren an sich, die die vorstehend erläuterten Enzyme und/oder Antigene spezifisch erkennen und binden. Die allgemeine Vorgehensweise und die entsprechenden Techniken zur Erzeugung polyklonaler und monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann gleichfalls wohlbekannt.

Beispielhaft wurde rekombinantes GnTI-Protein aus *Solanum tuberosum* mit 10 N-terminalen Histidin-Resten („His-tag“) durch Verwendung eines Fragments der in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 dargestellten *GnTI*-cDNA (Nukleotide 275 bis 1395) in *E. coli* überexprimiert und nach Affinitätsreinigung über eine Metall-Chelat-Matrix als Antigen zur Erzeugung von polyklonalen Antisera in Kaninchen eingesetzt (vgl. Beispiele 5 und 6).

Eine Anwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen Antikörper besteht für das „Screenen“ von Pflanzen auf das Vorhandensein von N-Acetylglucosaminyltransferase I.

Eine Bindung des erfindungsgemäßen Antikörpers an pflanzliche(s) Protein(e) zeigt das Vorliegen eines mit diesem Antikörper nachweisbaren N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyms an. In einem späteren Schritt kann dieser Antikörper darüberhinaus, in der Regel dann kovalent an einen Träger gebunden,

- 9 -

gegebenenfalls auch zur Anreicherung oder Reinigung des Enzyms mittels Säulenchromatographie eingesetzt werden.

Ein negatives Bindungsergebnis mit dem erfindungsgemäßen Antikörper, d.h. fehlende Bindung an die pflanzlichen Proteine, läßt wiederum auf ein fehlendes (oder durch Mutation stark verändertes) N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym und damit auf fehlende oder stark verminderte N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze schließen.

Techniken zum Ausführen der vorstehend angesprochenen „Screening“-Tests oder zur Enzymanreicherung bzw. -reinigung unter Einsatz von Antikörpersäulen oder anderen Affinitätsmatrices (vgl. Beispiele 5 und 6) sind dem Fachmann wohlbekannt.

iii) DNA-Sequenzen

Die Erfindung umfaßt ferner DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, einschließlich davon gemäß den vorstehenden Maßgaben abgeleitete Aminosäuresequenzen kodieren. Insbesondere betrifft die Erfindung das den in den Figuren 2 und 3B und im Sequenzprotokoll aufgeführten Aminosäuresequenzen jeweils zugrundeliegende Gen, und ganz besonders die in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNA-Sequenzen, sowie von diesen Genen und DNA-Sequenzen abgeleitete DNA-Sequenzen.

Unter abgeleiteten DNA-Sequenzen werden Sequenzen verstanden, die durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einzelnen oder mehreren und/oder kleineren Gruppen von Nukleotiden der vorstehend angegebenen Sequenzen und/oder durch Verkürzung oder Verlängerung am 5'- und/oder 3'-Ende erhalten werden. Die Modifizierungen innerhalb der DNA-Sequenz können zu abgeleiteten DNA-Sequenzen führen, die identische Aminosäuresequenzen verglichen mit der von der Ausgangs-DNA-Sequenz kodierten Aminosäuresequenz kodieren, oder aber auch zu solchen, bei denen einzelne oder einige wenige Aminosäuren gegenüber der Aminosäuresequenz, die die Ausgangs-DNA-Sequenz kodiert, verändert,

-10-

d.h. substituiert, deletiert und/oder insertiert sind, oder auch solchen, die - ggf. zusätzlich - C- und/oder N-terminal verkürzt und/oder verlängert sind.

Die Erfindung erstreckt sich gleichfalls auf die zu den erfindungsgemäßen Genen und DNA-Sequenzen komplementären Sequenzen sowie auf deren RNA-Transkriptionsprodukte.

Von der Erfindung umfaßt sind insbesondere sämtliche, nach den vorstehend angegebenen Maßgaben abgeleiteten Sequenzen, die unter stringenten Bedingungen mit den oben erläuterten Ausgangssequenzen oder den dazu komplementären Sequenzen oder Teilen davon hybridisieren, wie auch DNA-Sequenzen, die derartige Sequenzen umfassen.

Als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen im Sinne der Erfindung wird eine Hybridisierung bei Vorgehensweise gemäß einem oder mehreren der nachstehend angegebenen Verfahren verstanden. Hybridisieren: Bis zu 20 Std. in PEG-Puffer nach Church und Gilbert (0,25 M Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 1% (w/v) BSA, 7% (w/v) SDS, pH 7,5 mit Phosphorsäure; Ref. 22) bei 42°C oder in Standard-Hybridisierungspuffern mit Formamid bei 42°C oder ohne Formamid bei 68°C (Ref. 23). Waschen: 3-mal 30 min bei 65°C in 3-fach SSC-Puffer (Ref. 23), 0,1% SDS.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist der Begriff „Hybridisierung“ stets als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wie vorstehend angegeben, zu verstehen, auch wenn dies im Einzelfall nicht explizit angegeben ist.

Darüberhinaus erstreckt sich die Erfindung auch auf Fragmente der vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen, einschließlich der nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen, auf von derartigen Fragmenten durch Nukleinsäuresubstitution, -insertion und/oder -deletion abgeleitete Fragmente sowie auf die entsprechenden Fragmente mit dazu komplementären Sequenzen. Derartige Fragmente sind u.a. als Sequenzierungs- oder PCR-

- 11 -

Primer, „Screening“-Sonden und/oder für Verwendungen, wie sie nachfolgend erläutert werden, geeignet. Für eine Verwendung als „Screening“- oder Hybridisierungssonde werden die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente häufig radioaktiv markiert eingesetzt. Fragmente mit Sequenzen, die von den vorstehend definierten Ausgangssequenzen durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einem oder mehreren Nukleotiden abgeleitet sind, bzw. die dazu komplementären Sequenzen sind in dem Umfange von der Erfindung umfaßt, als sie unter den vorstehend angegebenen stringenten Bedingungen mit den Ausgangssequenzen bzw. den dazu komplementären Sequenzen hybridisieren.

Erfindungsgemäße DNA-Fragmente können beispielsweise auf der Grundlage der im Sequenzprotokoll und in Figur 2 angegebenen DNA-Sequenzen ausgehend von pflanzlicher DNA mittels Restriktionsendonukleasen unter Nutzung geeigneter Restriktionsschnittstellen oder durch Einsatz von PCR mittels geeignet synthetisierter Primer erhalten oder alternativ auch chemisch synthetisiert werden. Derartige Techniken sind dem Fachmann wohlbekannt.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch jegliche DNA-Sequenzen, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die in ihrer Gesamtheit oder in einem Teilabschnitt

- mit einer der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder
- mit einem oder mehreren der erfindungsgemäßen DNA-Fragmente und/oder
- mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Als DNA-Fragmente werden hierzu Hybridisierungs- oder „Screening“-Sonden eingesetzt, die üblicherweise mindestens 15 Nukleotide, typischerweise zwischen 15 und 30 Nukleotide, gegebenenfalls aber auch wesentlich mehr, umfassen. Es können dafür

- 12 -

beispielsweise die in Beispiel 1 eingesetzten Primer Verwendung finden. Alternativ können DNA-Sequenzen geeigneter Länge, abgeleitet von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen, eingesetzt werden. Als dritte Möglichkeit können geeignete erfindungsgemäße Hybridisierungssonden ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes entwickelt werden.

In diesem Sinne sind Gegenstand der Erfindung auch N-Acetylglucosaminyltransferase I kodierende Gene, die insbesondere aus anderen Varietäten oder Pflanzenarten aufgrund ihrer Hybridisierung mit den vorstehend angegebenen Hybridisierungssonden aufgefunden werden können, sowie davon gemäß den vorstehend erläuterten Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, DNA-Fragmente und -Konstrukte.

Die Isolierung des jeweiligen Gens und die Sequenzierung desselben nach der Auffindung mittels der erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden liegen im Bereich der Fähigkeiten eines Fachmanns auf diesem Gebiet und sind exemplarisch in den Beispielen für N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* und die entsprechenden Enzyme aus *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* erläutert.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich auch „antisense“-Sequenzen bezüglich jeglichen vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen.

iv) Konstrukte

Von der Erfindung werden auch Konstrukte umfaßt, die ggf. neben zusätzlichen 5'- und/oder 3'-Sequenzen, z.B. Linkern und/oder regulatorischen DNA-Sequenzen, oder andersartigen Modifikationen die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, einschließlich der wie vorstehend ausgeführt abgeleiteten DNA-Sequenzen, umfassen.

- 13 -

Ein Beispiel hierfür sind Hybridisierungs- oder „Screening“-Sonden, die zusätzlich zu einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz noch ein in diesem Fall meist nichtradioaktives Nachweismittel für die Detektion von Hybridisierungsprodukten umfassen, z.B. fluoreszierende oder phosphoreszierende Moleküle, Biotin, Biotinderivate, Digoxigenin und Digoxigeninderivate. Es kommen in diesem Zusammenhang jedoch auch radioaktive oder nichtradioaktive Nachweismittel, die z.B. durch Endmarkierung an die erfindungsgemäße DNA-Sequenz angeheftet werden können, in Betracht.

Gegenstand der Erfindung sind auch „antisense“- und „sense“-Konstrukte bezüglich der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und -Fragmente, nämlich bezüglich

- der im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen und der zugrundeliegenden Gene,
- der davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen,
- eines oder mehrerer Abschnitte dieser DNA-Sequenzen,
- DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten oder Pflanzenarten, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, welches das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die
 - mit einer der vorstehend genannten DNA-Sequenzen und/oder
 - mit einem oder mehreren der vorstehend genannten DNA-Fragmente und/oder
 - mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist,

unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Des weiteren erstreckt sich die Erfindung auch auf jegliche DNA-Übertragungssysteme, wie Vektoren, Plasmide, Viren- und Phagen Genome oder Cosmide, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, z.B. das *GntI*-Gen, erfindungsgemäße cDNA und DNA-Abschnitte, wie sie im Sequenzprotokoll angegeben sind, Frag-

- 14 -

mente davon, insbesondere „antisense“- oder „sense“-Konstrukte und/oder davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, enthalten.

Diverse Techniken zur Gewinnung oder Synthese erfindungsgemäßer DNA, DNA-Fragmente, Konstrukte und Übertragungssysteme, z.B. ausgehend von pflanzlicher DNA durch Restriktion mittels Restriktionsendonukleasen, PCR-Amplifizierung unter Einsatz geeigneter Primer, ggf. gefolgt von Klonierung und zusätzlicher chemischer oder enzymatischer Modifizierung, sind dem Fachmann wohlbekannt.

Eine Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden liegt im Nachweis von N-Acetylglucosaminyltransferase I-Genen in anderen Pflanzen als jenen, aus denen die im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen erhalten wurden, oder im Nachweis von möglichen (weiteren) Isoformen des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens in den Ausgangspflanzen *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana*.

Kann für das Hybridisierungsexperiment auf eine genomische Bank oder cDNA-Bank einer Pflanze zurückgegriffen werden, liefert ein positives Hybridisierungsergebnis bei einem derartigen „Screening“ oder Durchmustern der jeweiligen Bank den Hinweis auf einen Klon oder einige wenige Klone, die die gesuchte Sequenz, das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gen, vollständig oder teilweise in Verbindung mit nur einer begrenzten Menge weiterer DNA aus dem Genom der Zielpflanze enthalten, was die Klonierung und Sequenzierung des Zielgens entsprechend erleichtert. Alternativ kann ausgehend von pflanzlicher DNA und geeigneten Konstrukten, sogenannten PCR-Primern, auch eine PCR-Amplifikation des Gens oder von Teilen desselben vorgenommen werden, um Klonierung und Sequenzierung zu vereinfachen.

Ein Einsatz erfindungsgemäßer Sequenzierungsprimer, die ausgehend von geeigneten Abschnitten der erfindungsgemäßen Sequenzen synthetisiert werden, ermöglicht z.B. eine genomische Sequen-

-15-

zierung ausgehend von der vollständigen, durch Restriktionsendonukleasen geschnittenen genomischen DNA einer Zielpflanze mittels der Church-Gilbert-Technik wie auch z.B. eine Sequenzierung auf cDNA-Ebene nach RT-PCR-Amplifikation der Gesamt-RNA der Zielpflanze (vgl. Bsp. 1).

Eine alternative Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen abgeleitet sind, besteht in der erfindungsgemäßen Verwendung derselben zum Nachweis von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Das Hybridisierungsexperiment dient zur Detektion des Gens der N-Acetylglucosaminyltransferase I (*GntI*) und erlaubt z.B. aufgrund eines negativen Hybridisierungsergebnisses unter stringenten Bedingungen den Rückschluß auf ein Fehlen des *GntI*-Gens und damit fehlende N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze.

Derartige Hybridisierungstechniken zum Nachweis von Proteinen oder Genen insbesondere in Pflanzenmaterial mittels DNA-Sonden sind dem Fachmann ebenfalls geläufig. Es wird in diesem Zusammenhang auf die vorstehenden Ausführungen zu möglichen Hybridisierungsbedingungen unter Punkt iii) verwiesen. Geeignete DNA-Hybridisierungssonden umfassen in der Regel mindestens 15 Nukleotide mit einer Sequenz, die z.B. von den in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen oder den entsprechenden *GntI*-Genen abgeleitet ist.

v) Transformierte Mikroorganismen

Die Erfindung erstreckt sich des weiteren auf Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, Bakteriophagen, Viren, einzellige eukaryotische Organismen, wie Pilze, Hefen, Protozoen, Algen und humane, tierische und pflanzliche Zellen, die durch eine oder mehrere der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Konstrukte, wie vorstehend erläutert, transformiert wurden.

-16-

Verwendung finden erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen beispielsweise als Expressionssysteme für die transformierende Fremd-DNA zur Gewinnung der entsprechenden Expressionsprodukte. Typische Mikroorganismen für diese Zwecke sind Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*. Des weiteren können erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen, insbesondere Agrobakterien, z.B. zur Transformation von Pflanzen unter Weitergabe der transformierenden Fremd-DNA eingesetzt werden.

Verfahren zur Transformation von Mikroorganismenzellen durch (Fremd-)DNA sind dem Fachmann wohlbekannt.

Hierfür werden z.B. als Expressionsvektoren bezeichnete Konstrukte eingesetzt, die die erfindungsgemäße DNA-Sequenz unter Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten, um eine Expression der eingeschleusten DNA in der Ziel- oder Wirtszelle zu ermöglichen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Enzyme und Proteine unter Einsatz eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen transformierten Mikroorganismen. Das Verfahren umfaßt, mindestens einen durch erfindungsgemäße DNA, insbesondere eine der im Sequenzprotokoll angegebenen cDNAs, unter Kontrolle eines aktiven Promotors transformierten Mikroorganismus, wie vorstehend definiert, zu züchten und das erfindungsgemäße Enzym aus den Mikroorganismen und gegebenenfalls auch dem Kulturmedium zu isolieren. Das Verfahren erstreckt sich selbstverständlich auch auf die Gewinnung von den erfindungsgemäßen Enzymen aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* abgeleiteten Enzymen bzw. Proteinen, wie sie vorstehend unter i) definiert sind.

Verfahren zur Züchtung transformierter Mikroorganismen sind dem Fachmann wohlbekannt. Die Isolierung des exprimierten Enzyms

kann beispielsweise gemäß dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren mittels Metall-Chelat-Chromatographie oder alternativ durch Chromatographie an Säulen, die gegen das Enzym gerichtete Antikörper an das Packungsmaterial gebunden enthalten, erfolgen.

vi) Transgene Pflanzen

Die Erfindung umfaßt gleichfalls transgene Pflanzen, die mittels einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz bzw. eines entsprechenden Konstrukts transformiert worden sind. Es können so z.B. transgene Pflanzen erhalten werden, bei denen eine GntI-Defizienz, z.B. aufgrund eines fehlenden oder schadhafte GntI-Gens oder aufgrund von Defekten in den regulatorischen Bereichen dieses Gens, durch Komplementierung durch ein von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen abgeleitetes Konstrukt, dessen Expression unter Kontrolle eines aktiven konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors steht, beseitigt worden ist. Das aufgrund der in dem Konstrukt enthaltenen erfindungsgemäßen DNA exprimierte GntI-Enzym oder Protein mit GntI-Aktivität komplementiert in diesem Falle die in der Ausgangspflanze fehlende GntI-Aktivität.

Gleichfalls in Betracht gezogen werden transgene Pflanzen, in denen die in der Ausgangspflanze bereits vorhandene GntI-Aktivität durch zusätzliche Expression des durch ein erfindungsgemäßes Konstrukt eingeschleusten GntI-Transgens erhöht ist. Ein bei der Untersuchung des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase I in Pflanzen bestehendes Hauptproblem war bislang die überaus geringe Expression des GntI-Gens *in vivo*, verbunden mit einer überaus geringen Enzymaktivität, die entsprechend schwer nachzuweisen war. Durch Coexpression einer erfindungsgemäßen DNA kann das Problem zu geringer GntI-Enzymaktivität bei Pflanzen behoben werden.

In diesem Falle kann es bevorzugt sein, für die Transformation von Pflanzen erfindungsgemäße DNA einzusetzen, die zusätzlich

einen Sequenzabschnitt umfaßt, der nach Expression eine vereinfachte Detektierung und/oder Anreicherung bzw. Reinigung des Proteinproduktes mit GnTI-Aktivität ermöglicht. Beispielsweise gelingt dies durch Einsatz einer speziellen DNA-Sequenz für die Expression eines rekombinanten GnTI-Enzyms, die eine N- oder C-terminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker kodiert. Ist zusätzlich ein Aminosäuresequenzabschnitt zwischen GnTI-Enzym und Affinitätsmarker vorgesehen, der eine Erkennungsstelle für eine spezifische Protease darstellt, kann durch nachträglichen Einsatz dieser spezifischen Protease die N- oder C-terminale Sequenzverlängerung von dem GnTI-Enzym abgespalten und das GnTI-Enzym dadurch isoliert erhalten werden.

Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, die das rekombinante GnTI-Enzym mit einer C-terminalen Sequenzverlängerung, die den Affinitätsmarker AWRHPQFGG („Strep-tag“; Ref. 39) kodiert, und einer dazwischenliegenden Protease-Erkennungsstelle, IEGR, kodiert. Die Expression der erfindungsgemäßen DNA liefert GnTI-Enzyme mit der angegebenen C-terminalen Sequenzverlängerung, über welche die exprimierten Proteinmoleküle spezifisch an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix binden und so isoliert werden können. Mittels der die Aminosäuresequenz IEGR spezifisch erkennenden Protease Faktor Xa kann der GnTI-Anteil der Proteinmoleküle dann freigesetzt werden. Alternativ kann das vollständige Protein von der Streptavidin-derivatisierten Matrix mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden.

Ein weiteres Beispiel stellen erfindungsgemäße DNA-Sequenzen dar, die ein Protein kodieren, das zusätzlich zu einem GnTI-Enzym eine Mehrzahl, z.B. 10, N-terminal angefügte Histidin-Reste („His-tag“) umfaßt. Eine Isolierung bzw. Reinigung der exprimierten Proteine kann aufgrund der N-terminalen Histidin-Reste leicht durch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (z.B. Ni-Sepharose) erfolgen (vgl. auch Beispiel 5).

- 19 -

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Ein weiterer zentraler Aspekt der Erfindung ist die Verwendung der vorstehend erläuterten Sequenzinformation zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

Die Möglichkeiten zum Auffinden von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufgrund eines Gendefektes oder fehlenden Gens durch Einsatz erfindungsgemäßer Antikörper oder erfindungsgemäßer „Screening“- oder Hybridisierungs sonden wurden vorstehend bereits beschrieben.

Zwei weitere Möglichkeiten bestehen in der erfindungsgemäßen Verwendung von „antisense“- bzw. „sense“-DNA-Konstrukten, die von der DNA-Sequenz eines *GntI*-Gens einer Pflanze abgeleitet sind, zur Erzeugung transgener Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität mittels „homology-dependent gene silencing“ (vgl. Ref. 16,17). Die DNA-Sequenz, auf die zur Erzeugung der Konstrukte als Ausgangssequenz zurückgegriffen wird, kann dabei von der zu transformierenden Ausgangspflanze selbst oder aber auch von einer anderen Pflanzenvarietät oder -art stammen. Insbesondere finden „antisense“- oder „sense“-Konstrukte, wie sie vorstehend unter den Punkten iii) und iv) erläutert wurden, Verwendung. Die eingesetzten Konstrukte umfassen üblicherweise mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare.

Insbesondere umfassen die hierfür eingesetzten Konstrukte mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare mit einer Sequenz, die ausgehend

- von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen und/oder den entsprechenden *GntI*-Genen und/oder

- 20 -

- von den vorstehend erläuterten erfindungsgemäßen abgeleiteten DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmenten und/oder
- von DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die N-Acetylglucosaminyltransferase I kodieren und aufgrund einer Hybridisierung mit Hybridisierungs- oder „Screening“-Sonden, wie sie vorstehend unter Punkt iii) und iv) definiert wurden, unter stringenten Bedingungen aufgefunden werden können, abgeleitet wird.

Die Konstrukte enthalten in der Regel einen starken konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotor, unter dessen Kontrolle die „antisense“- oder „sense“-DNA-Sequenzabschnitte stehen.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von „antisense“-Konstrukt(en) in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch „antisense“-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription des „antisense“-Konstrukts oder der „antisense“-Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe ist beabsichtigt, auf RNA-Ebene eine Hybridisierung von Transkripten des *GntI*-Gens mit Transkripten des „antisense“-DNA-Abschnitts zu erzielen, die die Translation der *GntI*-mRNA verhindert. Die Folge ist eine transgene Pflanze mit stark verringerten Gehalten an N-Acetylglucosaminyltransferase I und damit einer stark verringerten entsprechenden Enzymaktivität.

Für die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen mit „antisense“-Konstrukten können beispielsweise Konstrukte eingesetzt werden, die mit einer der kompletten, in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNAs oder entsprechenden, in der Regel mindestens 50 bis über 200 Basenpaare umfassenden Abschnitten derselben hybridisieren. Insbesondere bevorzugt ist darüberhinaus die Verwendung von Fragmenten, deren Transkripte zusätzlich zu einer Hybridisierung mit einem Teil des 5'-untranslatierten Bereiches der *GntI*-mRNA führen, an dem oder in

- 21 -

dessen Nähe sich normalerweise die Anheftung der Ribosomen vollziehen würde. Beispiele für derartige Konstrukte sind in Fig. 4 gezeigt.

Angeichts des Vorkommens einer Isoform in *Solanum tuberosum* mit wahrscheinlich cytoplasmatischer Lokalisierung aufgrund des fehlenden Membranankers (As 10 bis 29) mit noch unbekannter Funktion kann es wünschenswert sein, lediglich das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym zu erfassen, das in den Golgi-Zisternen lokalisiert ist, d.h. nur jenes Enzym, das den Membrananker umfaßt. Ein Grund für diesen Wunsch kann das Bestreben oder im Einzelfalle auch die Notwendigkeit sein, den cytoplasmatischen Metabolismus der Pflanzenzelle, für den die cytoplasmatische N-Acetylglucosaminyltransferase I womöglich von Bedeutung ist, so wenig als möglich zu beeinträchtigen. Zu diesem Zweck können erfindungsgemäß „antisense“-Konstrukte eingesetzt werden, die bzw. deren Transkripte mit einem DNA- oder RNA-Abschnitt des *GntI*-Gens oder der *GntI*-mRNA hybridisieren, der einen Teil des 5'-untranslatierten Bereichs und den kodierenden Bereich - einschließlich des Membranankers - umfaßt. Eine Erstreckung des Hybridisierungsbereiches bis Position 266 der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 wird in der Regel für den genannten Zweck als unschädlich erachtet.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von „sense“-Konstrukten in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch „sense“-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des oder der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe wird in Anlehnung an die Arbeiten von Faske et al. (Ref. 17) in Tabak von Hybridisierungsphänomenen dieser Konstrukte mit dem endogenen *GntI*-Gen auf posttranskriptionaler bzw. auf DNA-Ebene ausgegangen, die letztlich die Translation des *GntI*-Gens beeinträchtigen oder verhindern. Das Resultat sind auch in diesem Falle transgene Pflanzen mit verminderter oder sogar fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

- 22 -

Verfahren zur stabilen Integration derartiger „antisense“- und „sense“-Konstrukte in das Genom von Pflanzen bzw. zur viralen Infektion von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression derartiger Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe sind dem Fachmann bekannt. Dazu gehören sowohl der direkte DNA-Transfer (z.B. in Protoplasten mittels Elektroporation oder durch Zusatz eines hochmolekularen Osmotikums sowie biolistische Methoden, bei denen DNA-umhüllte Teilchen in Pflanzengewebe geschossen werden) wie die Verwendung natürlicher Wirt/Vektor-Systeme (z.B. Agrobakterien oder Pflanzenviren). Für eine virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch entsprechende Konstrukte enthaltende Viren für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe stehen eine Reihe spezieller Viren, wie Tabakmosaikvirus (TMV) oder Kartoffelvirus X (potato virus X), zur Verfügung.

Beispielhafte Pflanzen, die für eine derartige Integration in Frage kommen, umfassen dikotyledone wie monokotyledone Kulturpflanzen, insbesondere Solanaceen wie Kartoffel, Tabak, Tomate und Paprika. Zusätzlich wären Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide geeignete Zielpflanzen für den Einsatz homologer „antisense“-Konstrukte. Beispielsweise erscheint die im Sequenzprotokoll angegebene Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* insbesondere als Ausgangssequenz für die erfindungsgemäße Transformation von Brassicaceen, wie z.B. Rapspflanzen, mittels „sense“- oder „antisense“-Konstrukten geeignet. Weitere Pflanzen von Interesse sind jegliche Pflanzen, die für Medizin und Forschung interessante Glykoproteine exprimieren.

Allgemein soll festgehalten werden, daß die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen, die in dem entsprechenden Bereich des *GntI*-Gens eine Homologie von $\geq 70\%$ auf Nukleotidebene zu den eingesetzten erfindungsgemäßen „antisense“- oder „sense“-

- 23 -

Konstrukten aufweisen, in der Regel zu erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen führt, die die gewünschte Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit wird ferner in einer zielgerichteten Zerstörung („Knock out“) des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens durch „gene targeting“ mittels homologer Rekombination (Ref. 24) in einer Zielpflanze durch Einsatz eines geeigneten, von der erfindungsgemäßen cDNA-Sequenz abgeleiteten DNA-Fragments gesehen, ähnlich der Vorgehensweise, wie sie beispielsweise für Hefe-Systeme und Säuger etabliert worden ist.

Die Erfindung umfaßt ferner transgene Pflanzen, die mit den vorstehend angesprochenen „antisense“- oder „sense“-Konstrukten bzw. mit diese enthaltenden Viren transformiert worden sind, sowie Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, z.B. durch Agrobakterien- oder Virus-vermittelten, wie auch direkten DNA-Transfer, sind dem Fachmann geläufig. Hinsichtlich beispielhafter Pflanzen für eine derartige Transformation gilt das vorstehend ausgeführte.

Die erfindungsgemäßen bzw. erfindungsgemäß gewonnenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität können erfindungsgemäß zur Herstellung von Glykoproteinen mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten eingesetzt werden. Wie bereits erläutert, sind derartige Glykoproteine für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Als preiswerte Rohstoff- und Nahrungsquelle sowie durch ihre problemlose Entsorgung über Kompostierung stellen Pflanzen per se ideale Bioreaktoren dar. Gemäß der vorstehend erläuterten Erfindung können jetzt biotechnologisch oder pharmazeutisch relevante Glykoproteine (z.B. Therapeutika mit niedrigem Antigenpotential für Säuger) in Kulturpflanzen exprimiert

- 24 -

werden, in denen GnTI-Aktivität stark gedrosselt ist oder vollständig fehlt.

Die Erfindung umfaßt dementsprechend auch ein Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer erfindungsgemäßen transgenen Pflanze, von Teilen derartiger Pflanzen oder von erfindungsgemäßen transformierten Pflanzenzellen, die jeweils das gewünschte Glykoprotein exprimieren, und das Isolieren des gewünschten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material.

Beispielhafte Kulturpflanzen sind in diesem Zusammenhang Solanaceen, insbesondere Kartoffel, Tabak, Tomate, und Paprika. Des weiteren kommen Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide in Frage.

Die Sequenz der enzymatisch gesteuerten, pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen, ist in Fig. 1 schematisch dargestellt. Die Blockierung der Biosynthese durch fehlende oder unzureichende N-Acetylglucosaminyltransferase I-(GlcNac-Transferase I)-Aktivität in einer Pflanze führt dazu, daß anstelle „komplexer“ Glykane hauptsächlich Glykane des $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -Typs, also Glykoproteine mit einheitlichen und wohldefinierten Zuckerresten gebildet werden, die für Medizin und Forschung von überaus hoher Bedeutung sind.

Hierzu können die Gene für die gewünschten Glykoproteine in ihren natürlichen Erzeugerpflanzen exprimiert werden, die erfindungsgemäß z.B. mittels „antisense“- oder „sense“-Konstrukten zu transgenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität transformiert wurden.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, erfindungsgemäße transgene Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität einzusetzen, die zusätzlich mit

-25-

dem Gen für das gesuchte Glykoprotein transformiert worden sind. Hierzu können Konstrukte eingesetzt werden, die das Gen für das gesuchte Glykoprotein unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten und die zu einer Integration des Gens in das Genom der Pflanze führen. Alternativ kann die Transformation auch durch virale Infektion durch ein das Gen für das gesuchte Glykoprotein enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des Gens erfolgen. Das Glykoprotein kann dann in der jeweiligen Wirtspflanze exprimiert und daraus gewonnen werden.

Es kann dabei selbstverständlich alternativ auch so vorgegangen werden, daß zunächst eine Transformation mit einem Expressionskonstrukt oder Virus, das die kodierende DNA des Glykoproteins enthält, vorgenommen wird und erst danach eine weitere Transformation mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen „antisense“- oder „sense“-Konstrukten oder einem oder mehreren Viren, die entsprechende DNA enthalten, erfolgt. Eine gleichzeitige Transformation mit beiden Konstrukten oder mit einem Virus, das sowohl das „antisense“- oder „sense“-Konstrukt als auch das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthält, ist ebenfalls möglich („Huckepack“-Version).

Im Rahmen der Erfindung wird auch eine virale Überinfektion erfindungsgemäßer transgener Pflanzen, bei denen bereits eine Integration des „antisense“/„sense“-Konstrukts und/oder des das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gens im Genom vorliegt, durch Viren, die „antisense“/„sense“-Konstrukt und/oder das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthalten, für eine zusätzliche extrachromosomale Propagation und Transkription bzw. Expression dieser DNA in Betracht gezogen. Hierdurch können die Konzentrationen an „antisense“- bzw. „sense“-DNA oder exprimiertem Glykoprotein in den transgenen Pflanzenzellen erhöht werden.

- 26 -

Für die erfindungsgemäße Gewinnung definiert glykosylierter Glykoproteine kann sich eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren beispielsweise in Fällen als sinnvoll erweisen, wenn beabsichtigt ist, die gewünschten Glykoproteine nur aus bestimmten Pflanzenteilen, wie der Knolle oder den Wurzeln, zu gewinnen. Für eine ganze Reihe von Pflanzengeweben stehen heute gewebespezifische Promotoren zur Verfügung, die eine Expression von Fremdgenen speziell nur in diesen Geweben bewirken. Beispielsweise können hier knollenspezifische Promotoren, wie Patatin Klasse I- (Ref. 26) und Proteinase Inhibitor II-Promotoren (Ref. 27) aufgeführt werden. Beide Promotoren zeigen unter bestimmten Bedingungen ebenfalls Expression in Blattgewebe, d.h. können durch hohe Metabolitgehalte (wie z.B. Saccharose) und im Fall des Proteinase Inhibitor II-Promotors auch durch mechanische Verwundung oder Besprühen mit Abscisin- bzw. Jasmonsäure induziert werden.

Eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren kann auch dann angezeigt sein, wenn sich die für die Transformation eingesetzte erfindungsgemäße DNA-Sequenz bzw. deren Transkriptions- oder Translationsprodukte für bestimmte Pflanzenteile als abträglich erweisen, z.B. durch negative Einwirkung auf den Metabolismus der entsprechenden Pflanzenzellen.

Als beispielhaftes Ziel-Glykoprotein kommt humane Glucocerebrosidase zur Therapie der erblichen „Gaucher“-Krankheit (Ref. 25) in Frage. Zur Gewinnung von humaner Glucocerebrosidase (GC) mit einheitlichen und definierten Zuckerresten können beispielsweise erfindungsgemäße mittels „antisense“-DNA transformierte Pflanzen mit dem Gen für humane Glucocerebrosidase transformiert werden. Dafür wird die cDNA-Sequenz für humane Glucocerebrosidase (Ref. 38) mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer am 3'-Ende so modifiziert, daß das rekombinante Enzym eine C-terminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker (z.B. AWRHPQFGG, „Strep-tag“; Ref. 39) und gegebenenfalls auch eine Protease-Erkennungsstelle (z.B. IEGR) zwischen GnTI-Enzymabschnitt und Affinitätsmarker kodiert. Die so

- 27 -

veränderte GC-cDNA-Sequenz wird unter Verwendung eines starken und ggf. gewebespezifischen Promotors (z.B. für Kartoffel unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Patatin-Promotors) in erfindungsgemäßen *GntI*-antisense-Pflanzen exprimiert, so daß das in diesen Pflanzen synthetisierte Enzym ausschließlich wohldefinierte N-Glykane trägt. Der Affinitätsmarker soll die Anreicherung des rekombinanten Enzyms aus den transgenen Pflanzen erleichtern. In diesem Falle binden die exprimierten Proteinmoleküle („GC-Strep“-Moleküle) über die Affinitätsmarkersequenz an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix und können von dieser mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden. Die Ablösung von der Streptavidin-derivatisierten Matrix kann auch mittels katalytischer Mengen einer Protease erfolgen, die eine Spezifität für die zwischen dem *GnTI*-Enzymabschnitt und dem Affinitätsmarker befindliche Protease-Erkennungsstelle aufweist. In diesem Falle wird nur der *GnTI*-Enzymabschnitt von der Matrix abgelöst. Dies kann insbesondere in dem Falle von Vorteil sein, wenn die Affinitätsmarkersequenz eine nachteilige Wirkung auf die *GnTI*-Aktivität ausübt.

Die $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Glykane der aus den erfindungsgemäßen Pflanzen gewonnenen Glucocerebrosidase werden aufgrund ihrer terminalen Mannose-Reste von Makrophagen als Aufnahmesignal erkannt und können daher direkt zur Therapie der erblichen „Gaucher-Krankheit“ eingesetzt werden. Eine Therapie ist derzeit nur durch aufwendige Isolierung und Deglykosylierung nativer Glucocerebrosidase möglich (Ref. 25).

Die Herstellung rekombinanter Glykoproteine läßt sich dementsprechend durch den Einsatz pflanzlicher *GntI*-Sequenzen im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, z.B. der technisch aufwendigen chemischen Deglykosylierung gereinigter Glykoproteine (Ref. 25) oder einer schwierigen und teuren Produktion in *GnTI*-defizienten tierischen Zelllinien (Ref. 7,10), stark vereinfachen.

Erläuterung der Figuren:

Fig. 1: Sequenz der pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen (Ref. 28). Der Biosyntheseblock zu „komplex“-modifizierten Glykanen beruht auf einem Defizit an GnTI-Aktivität (hervorgerufen entweder durch defektes oder fehlendes GnTI-Enzym oder durch effektive Drosselung der *GntI*-Genexpression) und ist durch ein Kreuz markiert. Bedeutung der Symbole: (F) Fucose-Reste, (X) Xylose-Reste, (●) GlcNac-Reste, (□) Mannose-Reste.

Fig. 2: Vollständige cDNA-Sequenz einer pflanzlichen GnTI aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) und davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Exemplarisch ist die vollständige cDNA der *GntI*-Isoform mit Membrananker aus Kartoffelblattgewebe (A1) dargestellt. Die EcoRI/NotI-Linker an den 5'- und 3'-Enden der cDNA sind durch Fettdruck hervorgehoben, die Bindestellen der für die RT-PCR-Sonde verwendeten degenerierten Oligonukleotide sind unterstrichen. Im Gegensatz zu bereits publizierten tierischen GnTI-Sequenzen enthält die abgeleitete Proteinsequenz der Kartoffel cDNA-Klone eine potentielle N-Glykosylierungsstelle: Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr, die mit einem Stern markiert ist. Die Region des Membranankers ist kursiv hervorgehoben (As 10 bis 29). Der Beginn der möglicherweise im Cytosol lokalisierten Isoform (A8) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Fig. 3: A, Identitäts- bzw. Ähnlichkeitsgrad der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer vollständigen *GntI*-cDNA-Sequenz aus Kartoffel (A1) im Vergleich mit anderen, aus Datenbanken ausgewählten GnTI-Sequenzen tierischer Organismen. Identische Aminosäurepositionen (in %) sind fett gedruckt, ähnliche Aminosäurepositionen stehen in Klam-

-29-

mern darunter. Bedeutung der Kürzel: Hu, Mensch; Ra, Ratte; Mo, Maus; Ce, *Caenorhabditis elegans* (Spulwurm); St, *Solanum tuberosum* (Kartoffel).

B, Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher *GntI*-cDNA-Klone. A_Stb-A1, *GntI* aus Kartoffelblatt; B_Ntb-A9, *GntI* aus Tabakblatt (A9); C_Atb-Full, *GntI* aus *Arabidopsis thaliana*. Identische As sind schwarz, ähnliche As hellgrau markiert.

Fig. 4: Klonierungsschema der verwendeten *GntI*-„antisense“-Konstrukte. In die *SalI*-Schnittstelle der Polylinkerregion des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein *NotI*-Linker eingeführt (= pA35N) und die vollständige A1-*GntI*-cDNA über *NotI* in pA35N inseriert. Das entsprechende „antisense“-Konstrukt (= pA35N-Alas) wurde über *EcoRI* und *HindIII* in den binären Vektor pBin19 (Ref. 30) inseriert. Des weiteren wurde nach PCR-Amplifikation ein ca. 270 Bp umfassendes 5'-Fragment der A1-*GntI*-cDNA über *XbaI*- und *NotI*-Schnittstellen in pA35N in „antisense“-Orientierung kloniert (= pA35N-A1-kurz) und ebenfalls in pBin19 inseriert. Abkürzungen: Zahlen in Klammern, Positionsangaben der Restriktionsschnittstellen in der A1-*GntI*-cDNA (in Basenpaaren); pBSK, Klonierungsvektor (Stratagene); pGEM3Z, Klonierungsvektor (Promega); CaMV p35S, konstitutiver Blumenkohl-Mosaikvirus-35S-Promotor; OCSpA, Octopinsynthase-Polyadenylierungssignal; pNOS, Nopalinsynthase-Promotor; NEO, Neomycinphosphotransferase (Selektionsmarker, vermittelt Kanamycinresistenz); NOSpA, Nopalinsynthase-Polyadenylierungssignal; LB/RB, „left/right border“ der T-DNA des binären Vektors; Pfeil, Translationsstart (ATG); A8, Beginn der potentiell cytosolisch lokalisierten *GntI*-Isoform (7 As-Austausche im Vergleich zu A1).

- 30 -

Fig. 5: Ausmaß der Suppression komplexer Glykoprotein-Modifikation in transgenen Kartoffelpflanzen, die mit dem langen *GntI*-"antisense"-Konstrukt (vgl. Fig. 4) transformiert wurden. A, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von Blattextrakten; B, "Western-Blot"-Analyse (Ref. 13,33) von Parallelproben mit einem "complex-glycan"-Antiserum (Ref. 12,13). Die Spuren enthalten je 30 µg Gesamtprotein: *cgl*(Ara), *Arabidopsis cgl*-Mutante (Ref. 13); WT(Desi), Kartoffel Wildtyp; die Nummern bezeichnen einzelne transgene Kartoffelpflanzen, die Pfeile Molmassenstandards von 66, 45, 36 und 29 kD.

Fig. 6: Nachweis der Spezifität des erzeugten *GnTI*-Antiserums nach Zellfraktionierung (Ref. 40) von Tabak-Kallusmaterial. Für die "Western Blot"-Analyse (Ref. 13, 33) wurden pro Spur je 30 µg Protein aufgetragen. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Spur 1, Homogenat nach Abtrennung von Zelltrümmern; Spur 2, Vesikel-Fraktion nach Säulenchromatographie; Spur 3, Saccharose-Gradient-Fraktion I (Mikrosomen); Spur 4, Saccharose-Gradient-Fraktion II (Plastiden); Spur 5, für die Immunisierung verwendetes Antigen (rekombinantes *GnTI*-Fusionsprotein; Pfeil, Molmasse von ca. 49 kD.

Erläuterung der im Text verwendeten Abkürzungen:

As, Aminosäure(n); Bp, Basenpaar(e); EMS, Ethylmethansulfonat (mutagene Chemikalie); F2, zweite Filialgeneration; Fuc, Fucose; Glc, Glucose; GlcNac, N-Acetylglucosamin; *GnTI*, N-Acetylglucosaminyltransferase I (EC 2.4.1.101); *GntI*, Gen für *GnTI* (Kern-codiert); kD, Kilodalton; Man, Mannose; PCR, Polymerasekettenreaktion; PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese; Ref., Referenz; RT-PCR, Reverse Transkription gekoppelt mit Polymerasekettenreaktion; SDS, Natriumdodecylsulfat; Var., Varietät; Xyl, Xylose.

- 31 -

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen eingehender erläutert. Die Beispiele werden lediglich zur Veranschaulichung der Erfindung aufgeführt und beschränken die Erfindung in keiner Weise.

Bsp. 1: Isolierung und Charakterisierung von pflanzlichen *GntI*-cDNA-Klonen.

Aus Kartoffel- und Tabak-Blattgewebe wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR in Kombination mit degenerierten Primern (Vorgehen analog zu Ref. 31), die von konservierten Aminosäurebereichen bekannter *GntI*-Sequenzen aus tierischen Organismen abgeleitet wurden („sense“-Primer 1*, 5'-TG(CT) G(CT)I (AT)(GC)I GCI TGG (AC)A(CT) GA(CT) AA(CT)-3'; „antisense“-Primer 3*, 5'-CCA ICC IT(AG) ICC (ACGT)G(CG) (AG)AA (AG)AA (AG)TC-3'; je 30 pMol Primer pro 50 µl PCR-Ansatz bei 55°C „annealing“-Temperatur und 45 Zyklen), cDNA-Fragmente von ca. 90 Bp amplifiziert. Nach Gelelektion wurden die Enden der PCR-Produkte repariert (d.h. durch DNA-Polymerase I glatte Enden erzeugt und mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert) und in die *EcoRV*-Schnittstelle von pBSK (Stratagene) kloniert. Die Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Kartoffel und Tabak RT-PCR-Produkte konnte durch Vergleich mit bekannten *GntI*-Sequenzen zwischen den Primern (Pfeile) als homolog bestätigt werden; \Rightarrow Q(R/M)QFVQDP(D/Y)ALYRS \Leftarrow (homologe As unterstrichen). Von je einem der Klone wurden mittels PCR radioaktiv markierte Sonden synthetisiert (Standard-PCR-Ansatz mit degenerierten Primern wie oben, Nukleotidmischung ohne dCTP, dafür mit 50 µCi α -³²P-dCTP [>3000 Ci/mMol] versetzt) und verschiedene cDNA-Banken mit den entsprechenden homologen Kartoffel- bzw. Tabak-Sonden auf *GntI*-haltige Klone durchgemustert (Vorgehen analog zu Ref. 31; „stringente“ Hybridisierungsbedingungen wurden bereits oben im Text definiert). Die cDNA-Banken wurden mit mRNA aus jungen, noch wachsenden Pflanzenteilen („sink“-Gewebe) hergestellt. Nach cDNA-Synthese und Ligieren von *EcoRI*/*NotI*-Adaptoren (cDNA-Synthese-Kit, Pharmacia) wurde mit *EcoRI*-kompatiblen Lambda-Armen ligiert, diese verpackt und damit *E. coli* XL1-Blue-Zellen trans-

- 32 -

fiziert (Lambda ZAPII Klonierungs- und Verpackungssystem, Strategene). Nach Amplifikation der Banken wurde je ein vollständiger *GntI*-Klon aus einer Kartoffelblatt-"sink"-Bank (A1 gemäß Fig. 2 und SEQ ID NO: 1) und einer Tabakblatt-"sink"-Bank (A9 gemäß SEQ ID NO: 3), sowie zwei weitere Klone aus einer Knollen-"sink"-Bank isoliert (A6, A8). Die abgeleiteten *GntI*-Aminosäuresequenzen enthalten im Gegensatz zu denen von Tieren eine potentielle N-Glykosylierungsstelle, Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr. Eine der *GntI*-cDNA-Sequenzen aus Knollen trägt vor dem ersten Methionin Stop-Codons in allen drei Leserahmen (A8). Der codierende Bereich ist zu dem längeren Knollenklon (A6) stark homolog (nur 2 As-Austausche), trägt jedoch eine völlig andere 5'-untranslatierte Region. Des weiteren fehlt der für das Golgi-Enzym charakteristische Membrananker, so daß diese *GntI*-Isoform im Cytosol lokalisiert sein könnte. Sequenzvergleiche wurden mithilfe der „gap“- bzw. „pileup“- und „box“-Option des GCG-„software“-Pakets (J Devereux, P Haeberli, O Smithies (1984) Nucl Acids Res 12: 387-395) erstellt und zeigen, daß die abgeleiteten pflanzlichen *GntI*-Aminosäuresequenzen zu denen aus tierischen Organismen nur 30-40% Identität und 57-59% Ähnlichkeit aufweisen (Fig. 3A), untereinander aber hoch homolog sind (75-90% Identität, Fig. 3B).

Bei *Arabidopsis thaliana* wurde analog vorgegangen, wobei zur Herstellung einer spezifischen Sonde zunächst eine *GntI*-Teilsequenz durch RT-PCR mit *GntI* „sense“-Primer 4A (5'-ATCGGAAAGCTTGGATCC CCA GTG GC(AG) GCT GTA GTT GTT ATG GCT TGC-3'; HindIII-Schnittstelle unterstrichen, BamHI fett gedruckt) und „antisense“-Primer 3*, wie vorstehend definiert, amplifiziert wurde. Aus einer Phagenbank (Lambda Uni-ZAP) wurde mit dieser Sonde zunächst ein 5'-unvollständiger cDNA-Klon isoliert. Durch Vektor-Insert-PCR wurde das fehlende 5'-Ende aus einer weiteren Bank amplifiziert und über eine unique SpeI-Schnittstelle im 5'-Bereich zu einer vollständigen cDNA-Sequenz zusammengesetzt. Die durch Sequenzierung ermittelte Nukleinsäuresequenz ist in SEQ ID NO: 5 aufgeführt.

Bsp. 2: Funktionelle Komplementierung eines *GntI*-Defekts mit *GntI*-cDNA bei transienter Expression in Protoplasten der *Arabidopsis thaliana cgl*-Mutante.

Ca. 4 Wochen nach Aussaat wurden Protoplasten aus Blättern steril angezogener *cgl*-Mutanten („Nichtfärber“-Pflanzen nach 5 Rückkreuzungen, Ref. 13) isoliert und mit Expressionskonstrukten der vollständigen *GntI*-cDNA-Sequenzen (NotI-cDNA-Fragmente, vgl. Fig. 4) in „sense“- (pA35N-Als bzw. pA35N-A9s) oder „antisense“-Orientierung (pA35N-Alas bzw. pA35N-A9as) transformiert und für 96 Std. bei Raumtemperatur abgedunkelt kultiviert (je 50 µg Plasmid-DNA pro 1 Mio. Protoplasten, PEG-Methode nach Ref. 32). Anschließend SDS-PAGE der Protoplastenextrakte und „Western Blot“-Analyse (analog zu Ref. 13,33) zeigte funktionelle Komplementierung des *GntI*-Defekts, d.h. „komplexe“ Glykosylierung zahlreicher Proteinbanden bei transienter Expression der Kartoffel Al- und Tabak A9-„sense“-, nicht aber der entsprechenden „antisense“-Konstrukte in Protoplasten der *Arabidopsis cgl*-Mutante (Daten nicht gezeigt).

Bsp. 3: Klonierung der binären Expressionskonstrukte pBin-35-Alas und pBin-35-Al-kurz (vgl. Fig. 4).

In die SalI-Schnittstelle der Polylinkerregion (entspricht pUC18) des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein NotI-Linker eingeführt (pA35N), und die vollständige Al-*GntI*-cDNA (Nukleotide 9 bis 1657, gemäß der cDNA in Fig. 2) über NotI in pA35N inseriert („sense“-Konstrukt pA35N-Als bzw. „antisense“-Konstrukt pA35N-Alas). Die Expressionskassetten der „sense“ bzw. „antisense“-Konstrukte wurden über die terminalen Schnittstellen (NcoI-Schnittstelle aufgefüllt, mit HindIII partial nachverdaut) als ca. 2410 Bp-Fragment isoliert und in die EcoRI- (aufgefüllt) und HindIII-Schnittstellen des binären Vektors pBin19 (Ref. 30) inseriert (= pBin-35-Als bzw. pBin-35-Alas). Durch Fusion mit der ebenfalls aufgefüllten NcoI-Schnittstelle des Fragments wird die EcoRI-Schnittstelle des Vektors regeneriert. Zusätzlich wurde

- 34 -

in einem Standard-PCR-Ansatz („sense“-Primer: KS-Sequenzprimer (Stratagene), verlängert für PCR, 5'-GGC CCC CCC TCG AGG TCG ACG GTA TCG-3'; „antisense“-Primer: 5'-GGGCCTCTAGACTCGAG AGC (CT)AC TAC TCT TCC TTG CTG CTG GCT AAT CTT G-3', XbaI-Schnittstelle unterstrichen, XhoI-Schnittstelle kursiv) bei 50°C „annealing“-Temperatur ein 5'-Fragment der *GntI*-cDNA amplifiziert (Nukleotide 9 bis 261, gemäß der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1). Das PCR-Produkt wurde mit XbaI (im „antisense“-Primer) und NotI (im 5'-Linker der cDNA) verdaut, als ca. 260 Bp-Fragment isoliert und in pA35N kloniert (= pA35N-A1-kurz). Die Expressionskassette des kurzen „antisense“-Konstrukts wurde als EcoRI/HindIII-Fragment (ca. 1020 Bp) ebenfalls in pBin19 inseriert (= pBin-35-A1-kurz).

Bsp. 4: Transformation von Agrobakterien durch die binären *GntI*-Konstrukte und Regeneration von transgenen Kartoffel- bzw. Tabakpflanzen aus infizierten Blattscheiben.

Die binären „antisense“-*GntI*-Konstrukte (pBin-35-Alas bzw. pBin-35-A1-kurz) wurden in den Agrobakterien-Stamm GV2260 transformiert (Ref. 34,35). Mit den rekombinanten Agrobakterienlinien wurden exemplarisch sterile Blattscheiben von Kartoffelpflanzen der Var. Désirée bzw. Tabakpflanzen der Var. Wisconsin 38 infiziert (50 µl einer frischen Übernachtskultur in 10 ml flüssigem 2MS-Medium: 2% Saccharose in Murashige & Skoog Salz/Vitamin-Standard-Medium, pH 5,6; Blattstückchen ohne Mittelrippen; Cokultivierung 2 Tage dunkel in Pflanzen-Klimakammern). Nach Waschen der infizierten Blattstückchen in 2MS-Medium mit 250 µg/ml Claforan wurden aus diesen in Gewebekultur unter Kanamycin-Selektion transgene Pflanzen regeneriert (Kartoffelprotokoll Ref. 26; Tabakprotokoll Ref. 36) und auf reduzierte *GnTI*-Aktivität getestet (exemplarisch in Fig. 5 für transgene Kartoffelpflanzen gezeigt). Wie aus Fig. 5 ersehen werden kann, war die "antisense"-Suppression komplexer Glykoprotein-Modifikation in der transgenen Kartoffelpflanze #439 erfolgreich. Die festgestellte Drosselung der komplexen Glykoprotein-Modifikation war in dieser Transformante über den ge-

- 35 -

samten Untersuchungszeitraum von mehreren Monaten stabil und wurde in drei, jeweils im Abstand von ca. 1 Monat durchgeführten Tests bestätigt. Analoge Ergebnisse wurden für die entsprechenden transgenen Tabakpflanzen erhalten.

Bsp. 5: Gewinnung von rekombinantem Kartoffel-GnTI-Protein (zur Antikörperproduktion).

Mit Hilfe des pET-Systems (Novagen) wurde rekombinante GnTI mit 10 zusätzlichen N-terminalen Histidin-Resten („His-tag“) in *E. coli* erzeugt und durch Metall-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Ein cDNA-Fragment, das die Nukleotide 275-1395 der Kartoffel *GntI*-cDNA umfaßt (entsp. As 75-446, Fig. 2 bzw. SEQ ID NO: 1 und 2), wurde mittels Standard-PCR („annealing“-Temperatur 50°C, 30 Zyklen, Ref. 31) amplifiziert („sense“-Primer *GntI*-5' fus: 5'-CATGGATCC CTC GAG AAG CGT CAG GAC CAG GAG TGC CGG C-3'; „antisense“-Primer *GntI*-3' stop: 5'-ATCCCGGGATCCG CTA CGT ATC TTC AAC TCC AAG TTG-3'; XhoI- bzw. BamHI Schnittstellen unterstrichen, Stop-Codon kursiv), und über die Restriktionsschnittstellen der synthetischen Primer (5'-XhoI-*GntI*-BamHI-3') in den Vektor pET16b (Novagen) inseriert (= pET-His-A1). Nach Vermehrung und Analyse in *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) wurde das Konstrukt als Glycerinkultur archiviert. Zur Überexpression wurden kompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen (Novagen) mit pET-His-A1 transformiert. Zugabe von IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid, ad 0,5-2 mM) zu einer logarithmisch wachsenden BL21-Kultur induziert zunächst die Expression von (bakterienchromosomaler) T7-RNA-Polymerase und damit ebenfalls die Expression des rekombinanten Fusionsproteins, das in pET-Vektoren (Novagen) unter T7-Promotor-Kontrolle steht. Aus induzierten BL21:pET-His-A1-Zellen wurde rekombinante Kartoffel-GnTI mit „His-tag“ unter denaturierenden Bedingungen (Hersteller-Protokoll, Novagen) mittels Metall-Chelat-Chromatographie an TALON-Matrix (Clontech) gereinigt und die Präparation mittels SDS-PAGE auf Einheitlichkeit überprüft.

- 36 -

Bsp. 6: Erzeugung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen.

Rekombinante Kartoffel-GnTI (aus Bsp. 5) wurde als Antigen verwendet. Nach Entnahme von einigen Millilitern Prä-Immunserum wurde den Kaninchen in dreiwöchigen Abständen 300-500 µg affinitätsgereinigtes Protein zusammen mit 25 µg GMDP-Adjuvans (Gerbu) subcutan injiziert. Nach drei Basis-Injektionen wurden die Tiere 12 bis 14 Tage nach der jeweiligen Folge-Injektion ("Boost") aus der Ohrvene geblutet, das Serum gewonnen (Ref. 37) und auf Erkennung rekombinanter GnTI in "Western Blot"-Analysen (1:200 bis 1:2000-Verdünnung) getestet. Das Antiserum der "Boosts" mit geringstem Hintergrund-zu-Signal-Verhältnis wurde mit 0,04% Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei +4°C bzw. längerfristig bei -20°C gelagert. Wie in Fig. 6 gezeigt, ergaben "Western Blot"-Analysen von Tabak-Kalluszellen (BY-2-Suspensionskultur) ein spezifisches GnTI-Signal in angereicherten Mikrosomenfraktionen, welches anzeigt, daß die gegen das rekombinante Protein hergestellten Antikörper pflanzliche GnTI spezifisch erkennen. Der Nachweis wurde mit angereicherten Mikrosomenfraktionen (ER und Golgi-Vesikel) durchgeführt, da GnTI-Protein, bedingt durch die geringen Mengen, in Pflanzen-Rohextrakten mit der verwendeten "Western-Blot"-Methode nicht nachzuweisen ist.

Referenzen

- 1) R Kornfeld, S Kornfeld (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664
- 2) GP Kaushal, T Szumilo, AD Elbein (1988). Structure and biosynthesis of plant N-linked glycans. In J Preiss (editor) *The Biochemistry of Plants, Vol 14: Carbohydrates*. Academic Press, San Diego, CA, pp 421-463
- 3) L Faye, MJ Chrispeels (1989) Apparent inhibition of β -fructosidase secretion by tunicamycin may be explained by breakdown of the unglycosylated protein during secretion. *Plant Physiol* 89: 845-851

- 37 -

- 4) TW Rademacher, RB Parekh, RA Dwek (1988) Glycobiology. Annu Rev Biochem 57: 785-838
- 5) A Sturm (1991) Heterogeneity of the complex N-linked oligosaccharides at specific glycosylation sites of 2 secreted carrot glycoproteins. Eur J Biochem 199: 169-179
- 6) K Olden, BA Bernard, MJ Humphries, T Yeo, SL White, SA Newton, HC Bower, JB Parent (1985) Function of glycoprotein glycans. Trends Biochem Sci 10: 78-82
- 7) P Stanley (1989) Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. Mol Cell Biol 9: 377-383
- 8) R Kumar, J Yang, RD Larsen, P Stanley (1990) Cloning and expression of N-acetylglucosaminyltransferase I, the medial Golgi transferase that initiates complex N-linked carbohydrate formation. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9948-9952
- 9) JW Dennis, S Laferte, C Waghorne, ML Breitman, RS Kerbel (1987) $\beta \rightarrow 6$ branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. Science 236: 582-585
- 10) MN Fukuda (1990) HEMPAS disease: genetic defect of glycosylation. Glycobiology 1: 9-15
- 11) MN Fukuda, KA Masri, A Dell, L Luzzatto, KW Moremen (1990) Incomplete synthesis of N-glycans in congenital dyserythropoietic anemia type II caused by a defect in the gene encoding α -mannosidase II. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7443-7447
- 12) M Laurière, C Laurière, MJ Chrispeels, KD Johnson, A Sturm (1989) Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of ex-

- 38 -

tracellular and vacuolar glycoproteins. Plant Physiol 90:
1182-1188

- 13) A von Schaewen, A Sturm, J O'Neill, MJ Chrispeels (1993)
Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks N-acetyl
glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Gol-
gi-modified complex N-linked glycans. Plant Physiol 102:
1109-1118
- 14) JK-C Ma, MB Hein (1995) Plant antibodies for immunotherapy.
Plant Physiol 109: 341-346
- 15) AS Moffat (1995) Medical applications: Exploring transgenic
plants as a new vaccine source. Science 268: 658-660
(Zusammenfassung von zwei Originalveröffentlichungen in
derselben Ausgabe)
- 16) CB Taylor (1997) Comprehending cosuppression. Plant Cell 9:
1245-1249 (Zusammenfassung von mehreren Originalveröffent-
lichungen in derselben Ausgabe)
- 17) M Faske, JE Backhausen, M Sendker, M Singer-Bayrle, R
Scheibe, A von Schaewen (1997) Transgenic tobacco plants
expressing pea chloroplast *Nmdh* cDNA in sense and antisense
orientation: Effects on NADP-MDH level, stability of trans-
formants, and plant growth. Plant Physiol 115: 705-715
- 18) R Koes, E Souer, A van Houwelingen, L Mur, C Spelt, F Quat-
trocchio, J Wing, B Oppedijk, S Ahmed, T Maes, T Gerats, P
Hoogeveen, M Meesters, D Kloos, JNM Mol (1995) Targeted ge-
ne inactivation in petunia by PCR-based selection of trans-
poson insertion mutants. Proc Acad Sci USA 92: 8149-8153
- 19) EC McKinney, N Ali, A Traut, KA Feldmann, DA Belostotsky,
JM McDowell, RB Meagher (1995) Sequence-based identifica-
tion of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mu-
tants *act2-1* and *act4-1*. Plant J 8: 613-622

- 20) F Altmann, G Kornfeld, T Dalik, E Staudacher, J Glössl
(1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N-acetylglucosaminyl transferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology* 3: 619-625
- 21) A Sturm, KD Johnson, T Szumilo, AD Elbein, MJ Chrispeels
(1987) Subcellular localization of glycosidases and glycosyltransferases involved in the processing of N-linked oligosaccharides. *Plant Physiol* 85: 741-745
- 22) GM Church, W Gilbert (1984) Genomic sequencing. *Proc Acad Sci USA* 81: 1991-1995
- 23) J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edn), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- 24) H Puchta, B Hohn (1996) From centiMorgans to base pairs: homologous recombination in plants. *Plant Sci* 1: 340-348
- 25) NW Barton, FS Furbish, GJ Murray, M Garfield, RO Brady
(1990) Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1913-1916
- 26) M Rocha-Sosa, U Sonnewald, W-B Frommer, M Stratmann, J Schell, L Willmitzer (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J* 8: 23-29
- 27) T Hildmann, M Ebner, H Pena-Cortes, JJ Sanchez-Serrano, L Willmitzer, S Prat (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157-1170

- 40 -

- 28) KD Johnson, MJ Chrispeels (1987) Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons. *Plant Physiol* 84: 1301-1308
- 29) H Höfte, L Faye, C Dickinson, EM Herman, MJ Chrispeels (1991) The protein-body proteins phytohemagglutinin and tonoplast intrinsic protein are targeted to vacuoles in leaves of transgenic tobacco. *Planta* 184: 431-437
- 30) M Bevan (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl Acids Res* 12: 8711-8721
- 31) K Graeve, A von Schaewen, R Scheibe (1994) Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 5: 353-361
- 32) B Damm, R Schmidt, L Willmitzer (1989) Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol Gen Genet* 213: 15-20
- 33) A von Schaewen, M Stitt, R Schmidt, L Willmitzer (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate, inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 9: 3033-3044
- 34) R Deblaere, B Bytebier, H De Greve, F Debroeck, J Schell, M van Montagu, J Leemans (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucl Acids Res* 13: 4777-4788
- 35) R Höfgen, L Willmitzer (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res* 16: 9877

- 41 -

- 36) T Voelker, A Sturm, MJ Chrispeels (1987) Differences in expression between two seed lectin alleles obtained from normal and lectin-deficient beans are maintained in transgenic tobacco. EMBO J 6: 3571-3577
- 37) E Harlow, D Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 38) J Sorge, C West, B Westwood, E Beutler (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of human cerebrosidase cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7289-7293
- 39) TGM Schmidt, A Skerra (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. Prot Engineering 6: 109-122
- 40) W van der Wilden, NR Gilkes, MJ Chrispeels (1980) The endoplasmic reticulum of mung bean cotyledons: role in the accumulation of hydrolases in protein bodies during seedling growth. Plant Physiol. 66: 390-394

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer transgenen Pflanze, von Teilen transgener Pflanzen oder von transformierten Pflanzenzellen und das Isolieren des gesuchten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze, die Teile transgener Pflanzen bzw. die transformierten Pflanzenzellen mit einem „antisense“-Konstrukt oder einem „sense“-Konstrukt, umfassend eine „antisense“-DNA bzw. „sense“-DNA bezüglich der DNA-Sequenz eines Gens oder einer cDNA für pflanzliche N-Acetylglucosaminyltransferase I oder eines Teils davon, zur Beseitigung oder Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in diesen transformiert ist bzw. sind, wobei das „antisense“- oder „sense“-Konstrukt gegebenenfalls zusätzlich regulatorische Sequenzen für die Transkription der entsprechenden „antisense“- oder „sense“-DNA enthält.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein „antisense“- oder „sense“-Konstrukt bezüglich einer der cDNAs, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* oder *Arabidopsis thaliana* kodieren, verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein „antisense“- oder „sense“-Konstrukt bezüglich einer der in den SEQ. ID. NO. 1, 3 oder 5 angegebenen DNA-Sequenzen verwendet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte transgene Pflanze zusätzlich mit dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen transformiert worden ist.

- 43 -

5. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* kodiert.
6. DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 1 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
7. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum* kodiert.
8. DNA nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
9. DNA, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA die in SEQ. ID. NO. 6 angegebene Aminosäuresequenz kodiert oder die in SEQ. ID. NO. 5 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
10. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die komplementäre Nukleotidsequenz zu der DNA nach Anspruch 6, 8 oder 9 aufweist.
11. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner oder mehrerer Nukleotide und/oder Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende einer der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 10 erhalten werden kann mit der Maßgabe, daß die DNA unter stringenten Bedingungen zumindest in einem Teilabschnitt mit der Ausgangs-DNA oder deren komplementärer Sequenz oder mit Teilen derselben hybridisiert.
12. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Gen darstellt oder Teil eines Gens ist, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und über ihre gesamte Länge hinweg oder in einem Teilabschnitt
 - mit einer der DNA-Sequenzen oder -Fragmente nach einem der Ansprüche 5 bis 11 und/oder

- 44 -

- mit einer DNA-Sequenz, die von den in den SEQ ID NO: 1, 3 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

13. DNA-Konstrukt,

dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere der DNAs gemäß einem der Ansprüche 5 bis 14 umfaßt.

14. DNA-Konstrukt nach Anspruch 13,

dadurch gekennzeichnet, daß es eine „antisense“- oder „sense“-DNA bezüglich der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 5 bis 12 und ggf. regulatorische Sequenzen für die Transkription der „antisense“- bzw. „sense“-DNA umfaßt.

15. Vektor, Plasmid, Cosmid, Viren- oder Phagengenom,

dadurch gekennzeichnet, daß er oder es zumindest eine DNA und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 14 umfaßt.

16. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum*.

17. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum*.

18. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana*,

dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

19. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet,

daß das Enzym die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

20. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet,

daß das Enzym die Aminosäuren 74 bis 446 der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt.

- 45 -

21. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 4 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
22. N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich aufgrund der Hybridisierung ihres Gen oder eines oder mehrerer Abschnitte ihres Gens mit einer oder mehreren der DNAs und/oder DNA-Fragmente gemäß einem der Ansprüche 5 bis 12.
23. Von den Enzymen gemäß einem der Ansprüche 16 bis 22 durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren und/oder durch N- und/oder C-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme oder Proteine.
24. Protein oder Peptid, umfassend einen oder mehrere Abschnitte der Aminosäuresequenz(en) eines oder mehrerer der in einem der Ansprüche 16 bis 23 definierten Enzyme.
25. Protein oder Peptid, welches durch eine der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 12 kodiert wird.
26. Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß es
- die in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz oder
 - die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder
 - eine durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren von den in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegebenen Aminosäuresequenzen abgeleitete Aminosäuresequenz oder
 - einen Teil oder mehrere Teile dieser Sequenzen
- umfaßt mit der Maßgabe, daß das Antigen bei Immunisierung eines Wirtes mit diesem zur Bildung einer immunologischen Reaktion einschließlich der Erzeugung von gegen das Antigen gerichteten Antikörpern führt.

- 46 -

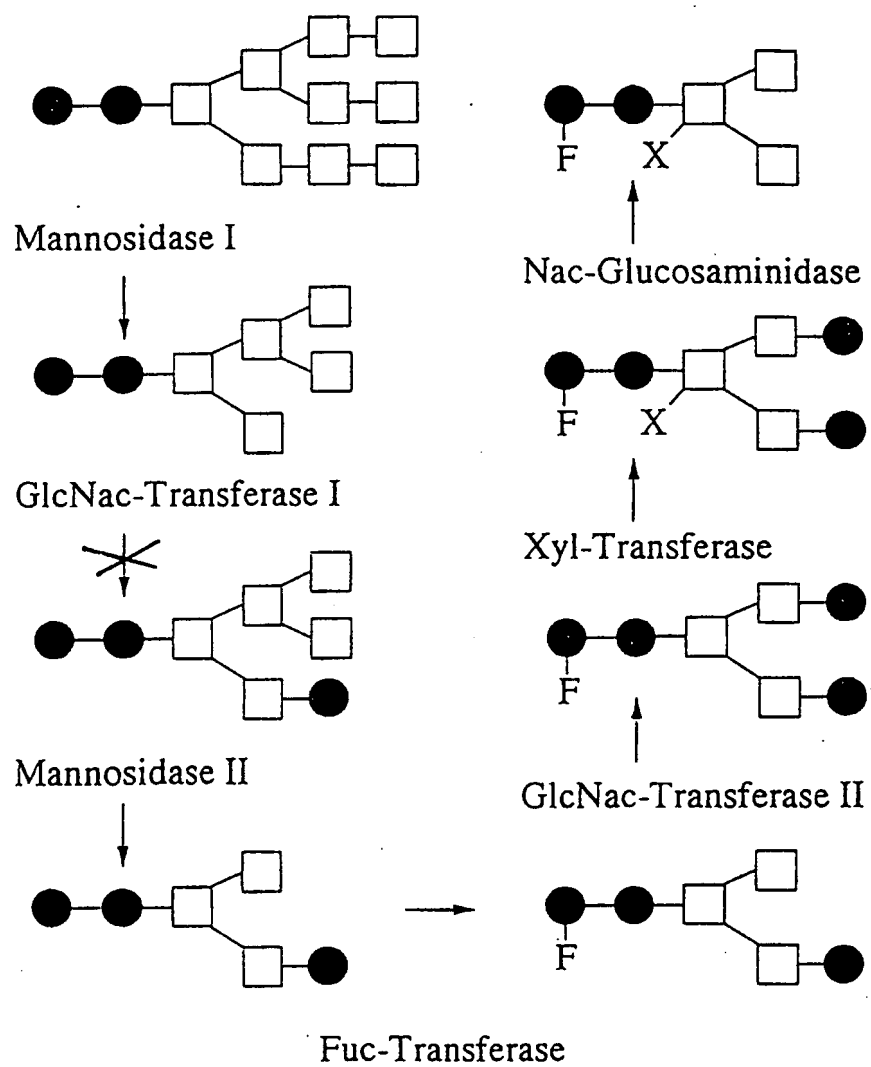
27. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch eines oder mehrere der Enzyme oder Antigene nach einem der Ansprüche 16 bis 26 erkennt und dieses oder diese bindet.

28. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er durch mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den DNAs, Konstrukten, Vektoren, Plasmiden, Cosmiden, Viren- oder Phagengenomen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 15 transformiert ist.

29. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle, erhältlich durch Integration einer oder mehrerer DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 13 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch Infektion durch ein eine oder mehrere DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 13 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression der DNA-Sequenz(en) oder des Konstrukts/der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.

30. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, erhältlich durch Integration eines oder mehrerer „antisense“- oder „sense“-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch virale Infektion durch ein ein oder mehrere „antisense“- bzw. „sense“-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription von dem oder den „antisense“-Konstrukt(en) oder von dem oder den „sense“-Konstrukt(en) in infiziertem Pflanzengewebe.

Figur 1



Figur 2

2/6

A1 *GntI* cDNA

GAATTCGCGG CCGCCTGAGA AACCCCTCGAA TTCAATTTTCG CATTTGGCAG AG ATG 55
Met
1

AGA GGG AAC AAG TTT TGC TTT GAT TTA CGG TAC CTT CTC GTC GTG GCT 103
Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val Ala
5 10 15

GCT CTC GCC TTC ATC TAC ATA CAG ATG CGG CTT TTC GCG ACA CAG TCA 151
Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln Ser
20 25 30

GAA TAT GTA GAC CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA AAT CAT TGT 199
Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His Cys
35 40 45

ACA AGT CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC AAG ATT AGC CAG CAG CAA GGA 247
Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln Gly
50 55 60 65

AGA GTA GTA GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CAT CAG GAC CAG GAG TGC 295
Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu Cys
70 75 80

CGG CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG GGC ATA AAA 343
Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile Lys
85 90 95

AAG TTA ATC GGA GAT GTG CAG ATG CCA GTG GCA GCT GTA GTT GTT ATG 391
Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val Met
100 105 110

GCT TGC AGT CGT ACT GAC TAC CTG GAG AGG ACT ATT AAA TCC ATC TTA 439
Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile Leu
115 120 125

AAA TAC CAA ACA TCT GTT GCA TCA AAA TAT CCT CTT TTC ATA TCC CAG 487
Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln
130 135 140 145

GAT GGA TCA AAT CCT GAT GTA AGA AAG CTT GCT TTG AGC TAT GGT CAG 535
Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln
150 155 160

CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TAT GAA CCT GTG CAT ACT GAA AGA 583
Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu Arg
165 170 175

CCA GGG GAA CTG GTT GCA TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAT TAC AAG TGG 631
Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp
180 185 190

GCA TTG GAT CAG CTG TTT CAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT GTT ATC ATA 679
Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile Ile
195 200 * 205

CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCT GCT GAT TTT TTT GAC TAT TTT GAG 727
Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu
210 215 220 225

Figur 2 (Fortsetzung)

GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG <u>GCT ATT TCT</u> Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile Ser 230 235 240	775
<u>TCT TGG AAT GAC AAT GGA</u> CAA AGG CAG TTC GTC CAA GAT CCT GAT GCT Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp Ala 245 250 255	823
CTT TAC CGC TCA <u>GAC TTT TTT CCT GGT CTT GGA TGG</u> ATG CTT TCA AAA Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser Lys 260 265 270	871
TCA ACT TGG TCC GAA CTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT TAC TGG GAT Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp 275 280 285	919
GAC TGG CTA AGG CTG AAA GAA AAT CAC AGA GGT CGA CAA TTT ATT CGC Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile Arg 290 295 300 305	967
CCA GAA GTT TGC AGA ACG TAC AAT TTT GGT GAG CAT GGT TCT AGT TTG Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu 310 315 320	1015
GGG CAG TTT TTT AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAG CTA AAT GAT GTC Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val 325 330 335	1063
CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTA AGT TAC CTT TTG GAG GAC AAC Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp Asn 340 345 350	1111
TAT GTG AAA CAC TTT GGC GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG CCC ATC CAC Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile His 355 360 365	1159
GGA GCT GAT GCT GTT TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT GAT GTG CGT Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val Arg 370 375 380 385	1207
ATT CAG TAC AGA GAC CAA CTA GAC TTT GAA GAT ATC GCT CGA CAG TTT Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln Phe 390 395 400	1255
GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGG GCA GCA TAT AAA Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr Lys 405 410 415	1303
GGG ATA GTA GTT TTC CGG TTT CAA ACA TCT AGA CGT GTG TTC CTT GTT Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu Val 420 425 430	1351
TCC CCT GAT TCT CTT CGA CAA CTT GGA GTT GAA GAT ACT TAG Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr End 435 440 445	1393
CGAAGATATG ATTGGAGCCT GAGCAACAAT TTAGACTTAT TTGGTAGGAT ACATTGAAA	1453
GAGCTGACAC GAAAAGTATG ACTACCAGTA GCTACATGCA ACATTTTAAT GTTAATGGAA	1513
GGAAACCCACT GCTTATTGTT GGAATGGATG AATCATCACC ACATCCTATT ATTCAAGTTT	1573
ACAAACATAA AGAGGAAATG TTGCCCTATA AAAACAAATT TTTTGTCTTCT AAGAAGGAAC	1633
GTTACGATTA TGAGCAACTT TGGCGGCCGC GAATTC	1669

Figur 3A

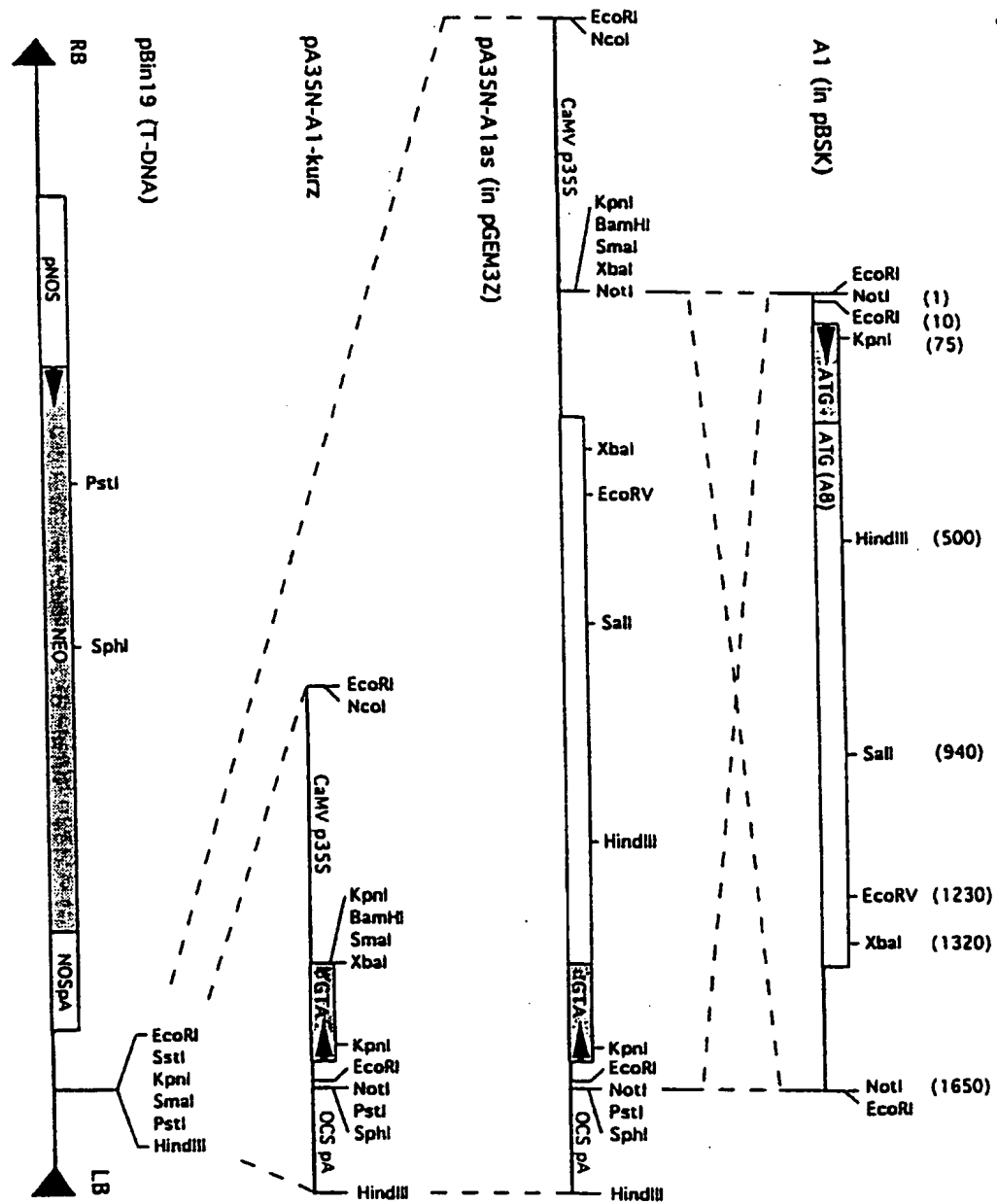
4/6

Hu	Ra	Mo	Ce	St
35 (59)	36 (57)	35 (59)	33 (57)	
	92 (95)	91 (94)	38 (57)	Hu
		90 (93)	38 (57)	Ra
			38 (58)	Mo

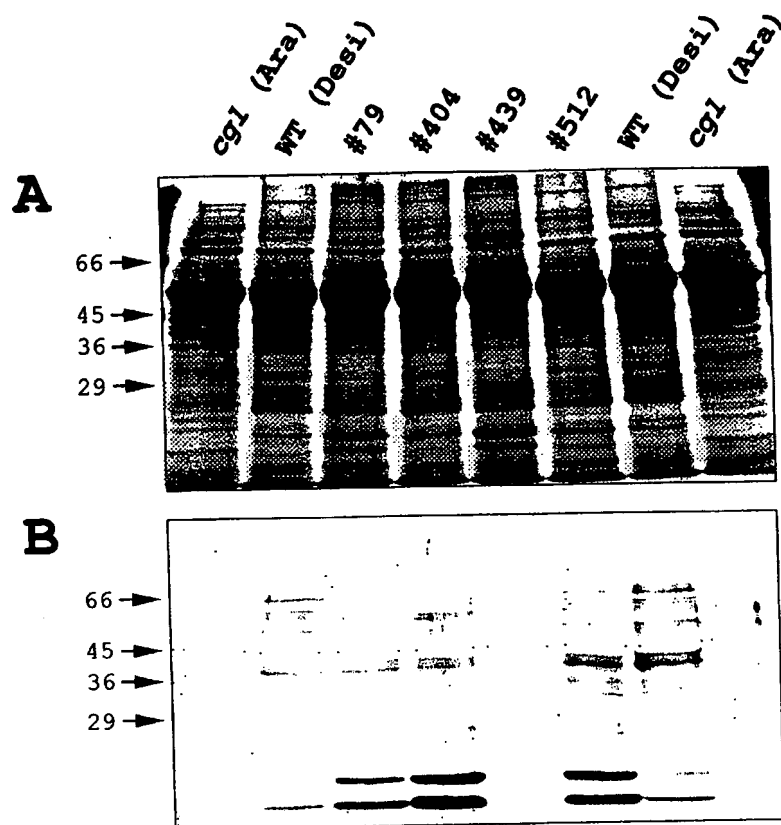
Figur 3B

A_Stb-A1	1	MRGNKFCE	DLRYLL	AAAF	AFIY	IOMRLF	FATQSEY	VDRLAA	AE	ENHCT
B_Ntb-A9	1	MRGNKFCCD	FRYLLI	AAAF	AFIY	IOMRLF	FATQSEY	ADRLAA	AE	ENHCT
C_Atb-Full	1	..MAFIS	CDLERLLI	PAAF	MEIY	IOMRLF	OTOS	YADRLS	AE	ENHCT
A_Stb-A1	51	SOTRLLID	KISQ	QGRIV	ALEE	QMKR	QDOEC	RQRL	AL	VODLES
B_Ntb-A9	51	SOTRLLID	KISQ	QGRIV	ALEE	QMKR	QDOEC	RQRL	AL	VODLES
C_Atb-Full	49	SOMRGLID	USEK	SRIV	ALE	EMKN	RODE	ELV	OL	DLTOTFEKGI
A_Stb-A1	101	GVOMP	VAAVV	MACSR	DY	LERT	IKSIL	KYOT	SV	ASKYPLFIS
B_Ntb-A9	101	GVOMP	VAAVV	MACSR	DY	LERT	IKSIL	KYOT	SV	ASKYPLFIS
C_Atb-Full	99	QGGOMP	VAAVV	MACSR	DY	LERT	IKSIL	KYOT	SV	ASKYPLFIS
A_Stb-A1	151	DVRKL	ALS	YG	OLTY	MOH	LD	FE	PV	HTERPGEL
B_Ntb-A9	151	DVRKL	ALS	YG	OLTY	MOH	LD	FE	PV	HTERPGEL
C_Atb-Full	149	AV	SK	ELSY	OLTY	MOH	LD	FE	PV	HTERPGEL
A_Stb-A1	201	KHNFS	RVI	ILED	DM	EIA	AD	FF	DY	FEAGATLL
B_Ntb-A9	201	KHNFS	RVI	ILED	DM	EIA	AD	FF	DY	FEAGATLL
C_Atb-Full	199	KHNFS	RVI	ILED	DM	EIA	AD	FF	DY	FEAGATLL
A_Stb-A1	251	FVQDP	D	ALY	RS	DF	FP	GL	GW	MLSKSTW
B_Ntb-A9	251	FVQDP	D	ALY	RS	DF	FP	GL	GW	MLSKSTW
C_Atb-Full	249	FVQDP	D	ALY	RS	DF	FP	GL	GW	MLSKSTW
A_Stb-A1	301	RQFIR	PE	V	C	R	T	Y	N	F
B_Ntb-A9	301	RQFIR	PE	V	C	R	T	Y	N	F
C_Atb-Full	299	RQFIR	PE	V	C	R	T	Y	N	F
A_Stb-A1	351	EDNY	V	K	H	F	G	D	L	V
B_Ntb-A9	351	EDNY	V	K	H	F	G	D	L	V
C_Atb-Full	349	EGNY	T	K	Y	E	S	G	L	V
A_Stb-A1	401	FGIFE	E	W	K	D	G	V	P	R
B_Ntb-A9	401	FGIFE	E	W	K	D	G	V	P	R
C_Atb-Full	399	FGIFE	E	W	K	D	G	V	P	R

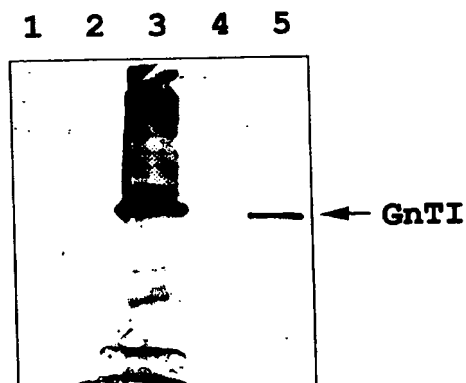
Figur 4



Figur 5



Figur 6



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: von Schaewen, Antje, Dr. rer. nat.
- (B) STRASSE: Natruperstrasse 169a
- (C) ORT: Osnabrück
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 49076
- (G) TELEFON: 0541-684029

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herstellung von Glykoproteinen in Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivitaet unter Verwendung pflanzlicher gntI-Sequenzen

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1669 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- (iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: Desiree
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
- (F) GEWEBETYP: Mesophyll
- (G) ZELLTYP: Blattzellen

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
- (B) CLON(E): gntI-A1(K)

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

- 2 -

- (B) LAGE:659..667
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine
potentielle Glykosylierungsstelle"
/product= "Konsensus Sequenz fuer
N-Glykosylierung"
/phenotype= "N-Glykane modulieren
Proteineigenschaften"
/standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
/label= pot-CHO
/note= "fehlt in tierischen GnTI-Sequenzen"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:53..1393
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 53
/function= "initiiert komplexe N-Glykane auf
sekret. Glykoproteinen"
/EC_number= 2.4.1.101
/product=
"beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "cgl"
/standard_name= "gntI"
/label= ORF
/note= "erste gntI-Sequenz aus Kartoffel
(unpubliziert)"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE:15..52

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE:1394..1655

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:80..139
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker
(Aminosäuren 10-29)"
/product= "hydrophober Aminosäurebereich in
GnTI"
/standard_name= "Membrananker eines Typ II
Golgi-Proteins"
/note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-
Sequenzen identifiziert"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1..14
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung der
cDNA-Bank in Lambda ZAP II"
/product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor"
/number= 1

- 3 -

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE:1656..1669

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor"
/number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCGCGG CCGCCTGAGA AACCTCGAA TTCAATTTCG CATTGGCAG AG ATG	55
Met	
1	
AGA GGG AAC AAG TTT TGC TTT GAT TTA CGG TAC CTT CTC GTC GTG GCT	103
Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val Ala	
5 10 15	
GCT CTC GCC TTC ATC TAC ATA CAG ATG CGG CTT TTC GCG ACA CAG TCA	151
Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln Ser	
20 25 30	
GAA TAT GTA GAC CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA AAT CAT TGT	199
Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His Cys	
35 40 45	
ACA AGT CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC AAG ATT AGC CAG CAG CAA GGA	247
Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln Gly	
50 55 60 65	
AGA GTA GTA GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CAT CAG GAC CAG GAG TGC	295
Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu Cys	
70 75 80	
CGG CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG GGC ATA AAA	343
Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile Lys	
85 90 95	
AAG TTA ATC GGA GAT GTG CAG ATG CCA GTG GCA GCT GTA GTT GTT ATG	391
Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val Met	
100 105 110	
GCT TGC AGT CGT ACT GAC TAC CTG GAG AGG ACT ATT AAA TCC ATC TTA	439
Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile Leu	
115 120 125	
AAA TAC CAA ACA TCT GTT GCA TCA AAA TAT CCT CTT TTC ATA TCC CAG	487
Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln	
130 135 140 145	
GAT GGA TCA AAT CCT GAT GTA AGA AAG CTT GCT TTG AGC TAT GGT CAG	535
Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln	
150 155 160	
CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TAT GAA CCT GTG CAT ACT GAA AGA	583
Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu Arg	
165 170 175	
CCA GGG GAA CTG GTT GCA TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAT TAC AAG TGG	631
Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp	
180 185 190	
GCA TTG GAT CAG CTG TTT CAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT GTT ATC ATA	679
Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile Ile	
195 200 205	

- 4 -

CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCT GCT GAT TTT TTT GAC TAT TTT GAG Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu 210 215 220 225	727
GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG GCT ATT TCT Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile Ser 230 235 240	775
TCT TGG AAT GAC AAT GGA CAA AGG CAG TTC GTC CAA GAT CCT GAT GCT Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp Ala 245 250 255	823
CTT TAC CGC TCA GAC TTT TTT CCT GGT CTT GGA TGG ATG CTT TCA AAA Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser Lys 260 265 270	871
TCA ACT TGG TCC GAA CTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT TAC TGG GAT Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp 275 280 285	919
GAC TGG CTA AGG CTG AAA GAA AAT CAC AGA GGT CGA CAA TTT ATT CGC Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile Arg 290 295 300 305	967
CCA GAA GTT TGC AGA ACG TAC AAT TTT GGT GAG CAT GGT TCT AGT TTG Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu 310 315 320	1015
GGG CAG TTT TTT AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAG CTA AAT GAT GTC Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val 325 330 335	1063
CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTA AGT TAC CTT TTG GAG GAC AAC Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp Asn 340 345 350	1111
TAT GTG AAA CAC TTT GGC GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG CCC ATC CAC Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile His 355 360 365	1159
GGA GCT GAT GCT GTT TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT GAT GTG CGT Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val Arg 370 375 380 385	1207
ATT CAG TAC AGA GAC CAA CTA GAC TTT GAA GAT ATC GCT CGA CAG TTT Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln Phe 390 395 400	1255
GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGG GCA GCA TAT AAA Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr Lys 405 410 415	1303
GGG ATA GTA GTT TTC CGG TTT CAA ACA TCT AGA CGT GTG TTC CTT GTT Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu Val 420 425 430	1351
TCC CCT GAT TCT CTT CGA CAA CTT GGA GTT GAA GAT ACT TAG Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr * 435 440 445	1393
CGAAGATATG ATTGGAGCCT GAGCAACAAT TTAGACTTAT TTGGTAGGAT ACATTTGAA	1453
GAGCTGACAC GAAAAGTATG ACTACCAGTA GCTACATGCA ACATTTTAAT GTTAATGGAA	1513
GGAACCCACT GCTTATTGTT GGAATGGATG AATCATCACC ACATCCTATT ATTCAAGTTT	1573

- 5 -

ACAAACATAA AGAGGAAATG TTGCCCTATA AAAACAAATT TTTTGTCTTCT AAGAAGGAAC 1633
 GTTACGATTA TGAGCAACTT TGGCGGCCGC GAATTC 1669

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 447 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln
 20 25 30
 Ser Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His
 35 40 45
 Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln
 50 55 60
 Gly Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu
 65 70 75 80
 Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile
 85 90 95
 Lys Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val
 100 105 110
 Met Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile
 115 120 125
 Leu Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser
 130 135 140
 Gln Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly
 145 150 155 160
 Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu
 165 170 175
 Arg Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys
 180 185 190
 Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile
 195 200 205
 Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe
 210 215 220
 Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile
 225 230 235 240
 Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp
 245 250 255

- 6 -

Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser
 260 265 270

Lys Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp
 275 280 285

Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile
 290 295 300

Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser
 305 310 315 320

Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp
 325 330 335

Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp
 340 345 350

Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile
 355 360 365

His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val
 370 375 380

Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln
 385 390 395 400

Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr
 405 410 415

Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu
 420 425 430

Val Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr *
 435 440 445

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1737 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Nicotiana tabacum
- (B) STAMM: Samsun NN
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
- (F) GEWEBETYP: Mesophyll
- (G) ZELLTYP: Blattzellen

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
- (B) CLON(E): gntI-A9(T)

- 7 -

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:733..741
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine potentielle Glykosylierungsstelle"
/product= "Konsensus Sequenz für N-Glykosylierung"
/phenotype= "N-Glykane modulieren Proteineigenschaften"
/standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
/label= pot-CHO
/note= "fehlt in tierischen GnTI-Sequenzen"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:127..1467
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 127
/function= "initiiert komplexe N-Glykane auf sekret. Glykoproteinen"
/EC_number= 2.4.1.101
/product= "beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "cgl"
/standard name= "gntI"
/label= ORF
/note= "erste gntI-Sequenz aus Tabak (unpubliziert)"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE:15..126

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE:1468..1723

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:154..213
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker (Aminosäuren 10-29)"
/product= "hydrophober Aminosäurebereich in GnTI"
/standard_name= "Membrananker eines Typ II Golgi-Proteins"
/note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-Sequenzen identifiziert"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1..14
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung der cDNA-Bank in Lambda ZAP II"
/product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor"
/number= 1

- 8 -

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE:1724..1737

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor"
/number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCGCGG CCGCCATTGA CTTGATCCTA ACTGAACAGG CAAAGTAAAT CCAGCGATGA	60
AACACTCATA ACTGAACACT GAGAGACTAT TCGCTTTCTC CTAAAGCCTT CAATCGAATT	120
CGCACG ATG AGA GGG AAC AAG TTT TGC TGT GAT TTC CGG TAC CTC CTC	168
Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Cys Asp Phe Arg Tyr Leu Leu	
450 455 460	
ATC TTG GCT GCT GTC GCC TTC ATC TAC ACA CAG ATG CGG CTT TTT GCG	216
Ile Leu Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Thr Gln Met Arg Leu Phe Ala	
465 470 475	
ACA CAG TCA GAA TAT GCA GAT CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA	264
Thr Gln Ser Glu Tyr Ala Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu	
480 485 490	
AAT CAT TGT ACA AGC CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC CAG ATT AGC CTG	312
Asn His Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gln Ile Ser Leu	
495 500 505	
CAG CAA GGA AGA ATA GTT GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CGT CAG GAC	360
Gln Gln Gly Arg Ile Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys Arg Gln Asp	
510 515 520 525	
CAG GAG TGC CGA CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG	408
Gln Glu Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys	
530 535 540	
GGC ATA AAA AAG TTG ATC GGA AAT GTA CAG ATG CCA GTG GCT GCT GTA	456
Gly Ile Lys Lys Leu Ile Gly Asn Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val	
545 550 555	
GTT GTT ATG GCT TGC AAT CGG GCT GAT TAC CTG GAA AAG ACT ATT AAA	504
Val Val Met Ala Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Lys Thr Ile Lys	
560 565 570	
TCC ATC TTA AAA TAC CAA ATA TCT GTT GCG TCA AAA TAT CCT CTT TTC	552
Ser Ile Leu Lys Tyr Gln Ile Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe	
575 580 585	
ATA TCC CAG GAT GGA TCA CAT CCT GAT GTC AGG AAG CTT GCT TTG AGC	600
Ile Ser Gln Asp Gly Ser His Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser	
590 595 600 605	
TAT GAT CAG CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TTT GAA CCT GTG CAT	648
Tyr Asp Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val His	
610 615 620	
ACT GAA AGA CCA GGG GAG CTG ATT GCA TAC TAC AAA ATT GCA CGT CAT	696
Thr Glu Arg Pro Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His	
625 630 635	

- 9 -

TAC AAG TGG GCA TTG GAT CAG CTG TTT TAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT Tyr Lys Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Asn Phe Ser Arg 640 645 650	744
GTT ATC ATA CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCC CCT GAT TTT TTT GAC Val Ile Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp 655 660 665	792
TTT TTT GAG GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG Phe Phe Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met 670 675 680 685	840
GCT ATT TCT TCT TGG AAT GAC AAT GGA CAA ATG CAG TTT GTC CAA GAT Ala Ile Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Met Gln Phe Val Gln Asp 690 695 700	888
CCT TAT GCT CTT TAC CGC TCA GAT TTT TTT CCC GGT CTT GGA TGG ATG Pro Tyr Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met 705 710 715	936
CTT TCA AAA TCT ACT TGG GAC GAA TTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT Leu Ser Lys Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala 720 725 730	984
TAC TGG GAC GAC TGG CTA AGA CTC AAA GAG AAT CAC AGA GGT CGA CAA Tyr Trp Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln 735 740 745	1032
TTT ATT CGC CCA GAA GTT TGC AGA ACA TAT AAT TTT GGT GAG CAT GGT Phe Ile Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly 750 755 760 765	1080
TCT AGT TTG GGG CAG TTT TTC AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAA CTA Ser Ser Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu 770 775 780	1128
AAT GAT GTC CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTT AGT TAC CTT TTG Asn Asp Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu 785 790 795	1176
GAG GAC AAT TAC GTG AAA CAC TTT GGT GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG Glu Asp Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys 800 805 810	1224
CCC ATC CAT GGA GCT GAT GCT GTC TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT Pro Ile His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly 815 820 825	1272
GAT GTG CGT ATT CAG TAC AGA GAT CAA CTA GAC TTT GAA AAT ATC GCA Asp Val Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asn Ile Ala 830 835 840 845	1320
CGG CAA TTT GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGT GCA Arg Gln Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala 850 855 860	1368
GCA TAT AAA GGA ATA GTA GTT TTC CGG TAC CAA ACG TCC AGA CGT GTA Ala Tyr Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Tyr Gln Thr Ser Arg Arg Val 865 870 875	1416
TTC CTT GTT GGC CAT GAT TCG CTT CAA CAA CTC GGA ATT GAA GAT ACT Phe Leu Val Gly His Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly Ile Glu Asp Thr 880 885 890	1464
TAA CAAAGATATG ATTGCAGGAG CCCGGGCAAA ATTTTGTACT TATTGGGTAG	1517

- 10 -

GATGCATCGA GCTGACACTA AACCATGATT TTACCAGTTA CATAACACGT TTTAATGTTA 1577
TACGGAGGAG CTCACTGTTC TAGTGTGAA GGGATATCGG CTTCTTAGTA TTGGATGAAT 1637
CATCAACACA ACCTATTATT TTAAGTGTTT AGAACATAAA GAGGAAATGT AGCCCTGTAA 1697
AGACTATACA TGGGACCATC ATAATCGCGG CCGCGAATTC 1737

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 447 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Cys Asp Phe Arg Tyr Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15
Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Thr Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln
20 25 30
Ser Glu Tyr Ala Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His
35 40 45
Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gln Ile Ser Leu Gln Gln
50 55 60
Gly Arg Ile Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys Arg Gln Asp Gln Glu
65 70 75 80
Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile
85 90 95
Lys Lys Leu Ile Gly Asn Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val
100 105 110
Met Ala Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Lys Thr Ile Lys Ser Ile
115 120 125
Leu Lys Tyr Gln Ile Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser
130 135 140
Gln Asp Gly Ser His Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Asp
145 150 155 160
Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val His Thr Glu
165 170 175
Arg Pro Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys
180 185 190
Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile
195 200 205
Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp Phe Phe
210 215 220

- 11 -

Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile
 225 230 235 240
 Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Met Gln Phe Val Gln Asp Pro Tyr
 245 250 255
 Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser
 260 265 270
 Lys Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp
 275 280 285
 Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile
 290 295 300
 Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser
 305 310 315 320
 Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp
 325 330 335
 Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp
 340 345 350
 Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile
 355 360 365
 His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val
 370 375 380
 Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asn Ile Ala Arg Gln
 385 390 395 400
 Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr
 405 410 415
 Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Tyr Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu
 420 425 430
 Val Gly His Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly Ile Glu Asp Thr *
 435 440 445

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1854 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cdNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Arabidopsis thaliana.
- (B) STAMM: Columbia
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: reife Pflanzen
- (F) GEWEBETYP: alle Gewebe

- 12 -

- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 (A) BIBLIOTHEK: Lambda Uni-ZAP (EcoRI/XhoI) und
 Lambda ACT (XhoI)
 (B) CLON(E): pBSK-Ara-GntI-full #8
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE:1185..1193
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine
 potentielle Glykosylierungsstelle"
 /product= "Konsensus Sequenz fuer
 N-Glykosylierung"
 /phenotype= "N-Glykane modulieren
 Proteineigenschaften"
 /standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
 /label= pot-CHO
 /note= "fehlt in tierischen GntI-Sequenzen"
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:135..1469
 (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 135
 /function= "initiiert komplexe N-Glykane auf
 sekret. Glykoproteinen"
 /EC_number= 2.4.1.101
 /product=
 "beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
 /evidence= EXPERIMENTAL
 /gene= "cgl"
 /standard_name= "gntI"
 /label= ORF
 /note= "erste gntI-Sequenz aus Arabidopsis
 (unpubliziert)"
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 (B) LAGE:19..134
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
 (B) LAGE:1470..1848
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:157..215
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker
 (Aminosäuren 8-27)"
 /product= "hydrophober Aminosäurebereich in
 GntI"
 /standard_name= "Membrananker eines Typ II
 Golgi-Proteins"
 /note= "durch Vergleich mit tierischen GntI-
 Sequenzen identifiziert"
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE:1..18

- 13. -

(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung
einer cDNA-Bibliothek in Lambda ACT"
/product= "XhoI-cDNA-Adaptor"
/number= 1

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1849..1854
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "XhoI-cDNA-Adaptor"
/number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CTCGAGGCCA CGAAGGCCAC CGTTTTGTT ATAACGAACG ACACCGTTC AAACAACTTC	60
CTTATTAGCT AGCTCCCTCC CGGCGGCAAA CACCAGAAGA TCCACCGCTT TTGATCTGGT	120
TGTTTGTCGT CGAT ATG GCG AGG ATC TCG TGT GAC TTG AGA TTT CTT CTC	170
Met Ala Arg Ile Ser Cys Asp Leu Arg Phe Leu Leu	
1 5 10	
ATC CCG GCA GCT TTC ATG TTC ATC TAC ATC CAG ATG AGG CTT TTC CAG	218
Ile Pro Ala Ala Phe Met Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Gln	
15 20 25	
ACG CAA TCA CAG TAT GCA GAT CGC CTC AGT TCC GCT ATC GAA TCT GAG	266
Thr Gln Ser Gln Tyr Ala Asp Arg Leu Ser Ser Ala Ile Glu Ser Glu	
30 35 40	
AAC CAT TGC ACT AGT CAA ATG CGA GGC CTC ATA GAT GAA GTT AGC ATC	314
Asn His Cys Thr Ser Gln Met Arg Gly Leu Ile Asp Glu Val Ser Ile	
45 50 55 60	
AAA CAG TCG CGG ATT GTT GCC CTC GAA GAT ATG AAG AAC CGC CAG GAC	362
Lys Gln Ser Arg Ile Val Ala Leu Glu Asp Met Lys Asn Arg Gln Asp	
65 70 75	
GAA GAA CTT GTG CAG CTT AAG GAT CTA ATC CAG ACG TTT GAA AAA AAA	410
Glu Glu Leu Val Gln Leu Lys Asp Leu Ile Gln Thr Phe Glu Lys Lys	
80 85 90	
GGA ATA GCA AAA CTC ACT CAA GGT GGA CAG ATG CCT GTG GCT GCT GTA	458
Gly Ile Ala Lys Leu Thr Gln Gly Gln Met Pro Val Ala Ala Val	
95 100 105	
GTG GTT ATG GCC TGC AGT CGT GCA GAC TAT CTT GAA AGG ACT GTT AAA	506
Val Val Met Ala Cys Ser Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Val Lys	
110 115 120	
TCA GTT TTA ACA TAT CAA ACT CCC GTT GCT TCA AAA TAT CCT CTA TTT	554
Ser Val Leu Thr Tyr Gln Thr Pro Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe	
125 130 135 140	
ATA TCT CAG GAT GGA TCT GAT CAA GCT GTC AAG AGC AAG TCA TTG AGC	602
Ile Ser Gln Asp Gly Ser Asp Gln Ala Val Lys Ser Lys Ser Leu Ser	
145 150 155	

- 14 -

TAT AAT CAA TTA ACA TAT ATG CAG CAC TTG GAT TTT GAA CCA GTG GTC Tyr Asn Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val Val 160 165 170	650
ACT GAA AGG CCT GGT GAA CTG ACT GCG TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAC Thr Glu Arg Pro Gly Glu Leu Thr Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His 175 180 185	698
TAC AAG TGG GCA CTG GAC CAG TTG TTT TAC AAA CAC AAA TTT AGT CGA Tyr Lys Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Ser Arg 190 195 200	746
GTG ATT ATA CTA GAA GAC GAT ATG GAA ATT GCT CCA GAC TTC TTT GAT Val Ile Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp 205 210 215 220	794
TAC TTT GAG GCT GCA GCT AGT CTC ATG GAT AGG GAT AAA ACC ATT ATG Tyr Phe Glu Ala Ala Ala Ser Leu Met Asp Arg Asp Lys Thr Ile Met 225 230 235	842
GCT GCT TCA TCA TGG AAT GAT AAT GGA CAG AAG CAG TTT GTG CAT GAT Ala Ala Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Lys Gln Phe Val His Asp 240 245 250	890
CCC TAT GCG CTA TAC CGA TCA GAT TTT TTT CCT GGC CTT GGG TGG ATG Pro Tyr Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met 255 260 265	938
CTC AAG AGA TCG ACT TGG GAT GAG TTA TCA CCA AAG TGG CCA AAG GCT Leu Lys Arg Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala 270 275 280	986
TAC TGG GAT GAT TGG CTG AGA CTA AAG GAA AAC CAT AAA GGC CGC CAA Tyr Trp Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Lys Gly Arg Gln 285 290 295 300	1034
TTC ATT GCA CCG GAA GTC TGT AGA ACA TAC AAT TTT GGT GAA CAT GGG Phe Ile Ala Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly 305 310 315	1082
TCT AGT TTG GGA CAG TTT TTC AGT CAG TAT CTG GAA CCT ATA AAG CTA Ser Ser Leu Gly Gln Phe Phe Ser Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu 320 325 330	1130
AAC GAT GTG ACG GTT GAC TGG AAA GCA AAG GAC CTG GGA TAC CTG ACA Asn Asp Val Thr Val Asp Trp Lys Ala Lys Asp Leu Gly Tyr Leu Thr 335 340 345	1178
GAG GGA AAC TAT ACC AAG TAC TTT TCT GGC TTA GTG AGA CAA GCA CGA Glu Gly Asn Tyr Thr Lys Tyr Phe Ser Gly Leu Val Arg Gln Ala Arg 350 355 360	1226
CCA ATT CAA GGT TCT GAC CTT GTC TTA AAG GCT CAA AAC ATA AAG GAT Pro Ile Gln Gly Ser Asp Leu Val Leu Lys Ala Gln Asn Ile Lys Asp 365 370 375 380	1274
GAT GAT CGT ATC CGG TAT AAA GAC CAA GTA GAG TTT GAA CGC ATT GCA Asp Asp Arg Ile Arg Tyr Lys Asp Gln Val Glu Phe Glu Arg Ile Ala 385 390 395	1322

- 15 -

GGG GAA TTT GGT ATA TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTG CCA CGA ACA 1370
 Gly Glu Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Thr
 400 405 410

GCA TAT AAA GGA GTA GTG GTG TTT CGA ATC CAG ACA ACA AGA CGT GTA 1418
 Ala Tyr Lys Gly Val Val Val Phe Arg Ile Gln Thr Thr Arg Arg Val
 415 420 425

TTC CTG GTT GGG CCA GAT TCT GTA ATG CAG CTT GGA ATT CGA AAT TCC 1466
 Phe Leu Val Gly Pro Asp Ser Val Met Gln Leu Gly Ile Arg Asn Ser
 430 435 440

TGA TGCAAAACAT ATGAAAGGAA AAGAAGATTT TGGACCGCAT GCAGCCTCCT 1519
 *

445

TCTAGCAGCT GTTAGGTTGT ATTGTTATTT ATGGATGAGT TTGTAGAGCG GTGGGGTTAA 1579

CTTTAACAGC AAGGAAGCTC TGGTGACCAG GCTGATTGGC TTAGAAGTTA TGGGAACCCC 1639

TTGAAAGGGT CAGGGTTAAA TATATTTTCAG TTGTTTTTATT AGTGATTATC TTGTGGGTAA 1699

CTTATACGAA TGCAATCAT TCTATGCAGT TTTTCTTCGT CCCACTTGTT TTGGCTTCTC 1759

TATTGCTAGT GTACATATCT CTTCAAACAT GTACTAAATA ATGCGTGTTG CTTCAAAGAA 1819

GTAAC TTTA TTAATAAAAAA AAAAAAAAC TCGAG 1854

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 445 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Arg Ile Ser Cys Asp Leu Arg Phe Leu Leu Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Phe Met Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Gln Thr Gln Ser Gln
 20 25 30

Tyr Ala Asp Arg Leu Ser Ser Ala Ile Glu Ser Glu Asn His Cys Thr
 35 40 45

Ser Gln Met Arg Gly Leu Ile Asp Glu Val Ser Ile Lys Gln Ser Arg
 50 55 60

Ile Val Ala Leu Glu Asp Met Lys Asn Arg Gln Asp Glu Glu Leu Val
 65 70 75 80

Gln Leu Lys Asp Leu Ile Gln Thr Phe Glu Lys Lys Gly Ile Ala Lys
 85 90 95

Leu Thr Gln Gly Gly Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val Met Ala
 100 105 110

- 16 -

Cys Ser Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Val Lys Ser Val Leu Thr
 115 120 125
 Tyr Gln Thr Pro Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln Asp
 130 135 140
 Gly Ser Asp Gln Ala Val Lys Ser Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Leu
 145 150 155 160
 Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val Val Thr Glu Arg Pro
 165 170 175
 Gly Glu Leu Thr Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp Ala
 180 185 190
 Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Ser Arg Val Ile Ile Leu
 195 200 205
 Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu Ala
 210 215 220
 Ala Ala Ser Leu Met Asp Arg Asp Lys Thr Ile Met Ala Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Trp Asn Asp Asn Gly Gln Lys Gln Phe Val His Asp Pro Tyr Ala Leu
 245 250 255
 Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Lys Arg Ser
 260 265 270
 Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp Asp
 275 280 285
 Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Lys Gly Arg Gln Phe Ile Ala Pro
 290 295 300
 Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu Gly
 305 310 315 320
 Gln Phe Phe Ser Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val Thr
 325 330 335
 Val Asp Trp Lys Ala Lys Asp Leu Gly Tyr Leu Thr Glu Gly Asn Tyr
 340 345 350
 Thr Lys Tyr Phe Ser Gly Leu Val Arg Gln Ala Arg Pro Ile Gln Gly
 355 360 365
 Ser Asp Leu Val Leu Lys Ala Gln Asn Ile Lys Asp Asp Asp Arg Ile
 370 375 380
 Arg Tyr Lys Asp Gln Val Glu Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Phe Gly
 385 390 395 400
 Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Thr Ala Tyr Lys Gly
 405 410 415
 Val Val Val Phe Arg Ile Gln Thr Thr Arg Arg Val Phe Leu Val Gly
 420 425 430

- 17 -

Pro	Asp	Ser	Val	Met	Gln	Leu	Gly	Ile	Arg	Asn	Ser	*
	435						440					445